

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



**INCURSIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE
ANTICANCEROSOS INNOVADORES : APROXIMACIÓN AL
DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR
DE TROMBINA PAR1 DE DERIVADOS DE 2-
OXOPIPERAZINAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ángel Manuel Valdivielso Pablo

Bajo la dirección de las doctoras

M^a del Rosario Herranz Herranz
Marta Gutiérrez Rodríguez

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



**INCURSIÓN EN LA INVESTIGACIÓN DE
ANTICANCEROSOS INNOVADORES: APROXIMACIÓN
AL DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANTAGONISTAS DEL
RECEPTOR DE TROMBINA PAR1
DERIVADOS DE 2-OXOPIPERAZINAS**

TESIS DOCTORAL

Ángel Manuel Valdivielso Pablo

**Directoras: Dra. M^a del Rosario Herranz Herranz
Dra. Marta Gutiérrez Rodríguez**

Madrid, 2012

ÍNDICE

NOTA SOBRE NOMENCLATURA.....	11
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS	11
ABREVIATURAS	13
ANEXO I: AMINOÁCIDOS	19
ANEXO II: GRUPOS PROTECTORES.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. ANTECEDENTES	25
1.1.1. Trombina: Una enzima esencial en homeostasis	25
1.1.2. Receptor de trombina PAR1: Estructura primaria, especificidad, activación, señalización y desensibilización.....	27
1.1.3. PAR1 en cáncer y angiogénesis.....	32
1.1.3.1. Asociación hipercoagulación-cáncer.....	32
1.1.3.2. Sobreexpresión de PAR1 en cáncer	32
1.1.3.3. Activación y señalización de PAR1 relacionadas con cáncer	33
1.1.3.4. PAR1 y angiogénesis.....	35
1.1.4. Activación de PAR1 por trombina: Estudios estructurales	36
1.1.5. Moduladores de PAR1	40
1.1.6. El anillo de 2-oxopiperazina: un esqueleto privilegiado en Química Médica...	47
1.2. HIPÓTESIS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ANTAGONISTAS DE PAR1	49

1.3. OBJETIVOS.....	51
1.4. PLAN DE TRABAJO	53
1.4.1. Optimización de la síntesis del antagonista de referencia RWJ-58259	53
1.4.2. Diseño de estructuras	53
1.4.3. Síntesis	55
1.4.4. Evaluación biológica	57
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL ANTAGONISTA PAR1 DE REFERENCIA RWJ-58259	61
2.1.1. Estudio de optimización de la <i>N</i> -alquilación en posición 1 del indazol. Preparación del 1-(2,6-diclorobencil)-indazol 35	65
2.1.2. Reducción del 6-nitroindazol 35 . Síntesis del 6-aminoindazol 36	67
2.1.3. Optimización de la formación de la urea y eliminación del grupo protector Boc	68
2.1.4. Conclusiones	70
2.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE Gly	73
2.2.1. Síntesis de los pseudipéptidos Boc-PheΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe	74
2.2.2. Síntesis de 2-oxopiperazinas derivadas de Boc-PheΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe	76
2.2.3. Funcionalización regioselectiva de las 2-oxopiperazinas (<i>RS</i>)-53	78
2.2.4. Síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en N ₁	83
2.2.5. Síntesis de ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas	88
2.2.6. Síntesis de ureas análogas del antagonista PAR1 de referencia RWJ-58259 ...	90
2.2.7. Evaluación biológica	91
2.2.7.1. Evaluación de la actividad antagonista sobre receptores PAR1	91
2.2.7.2. Evaluación de la actividad citotóxica.....	93
2.2.8. Conclusiones	94

2.3. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS	97
2.3.1. Síntesis de pseudodipéptidos Boc-XaaΨ[CH(CN)NH]Yaa-OMe.....	98
2.3.2. Construcción del anillo de 2-oxopiperazina	99
2.3.3. Alquilación selectiva de la posición N ₄ de 2-oxopiperazinas.....	102
2.3.4. Bencilación de la posición N ₁ de 2-oxopiperazinas	107
2.3.5. Síntesis de bencilureas derivadas de 2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de Arg	114
2.3.6. Síntesis de 3,7-dioxooctahidro-1 <i>H</i> -pirazino[1,2- <i>a</i>]pirazinas	116
2.3.7. Evaluación biológica	116
2.3.7.1. Evaluación de la actividad antagonista sobre receptores PAR1	116
2.3.7.2. Evaluación como agentes antitumorales.....	119
2.3.8. Conclusiones.....	120
3. CONCLUSIONES GENERALES	123
4. PARTE EXPERIMENTAL	127
4.1. PRODUCTOS DE PARTIDA COMERCIALES	129
4.2. MÉTODOS GENERALES	133
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL ANTAGONISTA DE REFERENCIA RWJ-58259.....	135
4.3.1. Síntesis de 6-nitro-1 <i>H</i> -indazol-3-carbaldehído (33).....	135
4.3.2. Síntesis de 6-nitro-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indazol (34).....	135
4.3.3. <i>N</i> -alquilación del indazol 34 . Síntesis de 1-(2,6-diclorobencil)-6-nitro-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indazol (35) y bromuro de 1-(2,6-diclorobencil)-3-[1-(2,6-diclorobencil)-pirrolidin-1-il]metil-6-nitro-1 <i>H</i> -indazol (43).....	136
4.3.3.1. Procedimiento descrito	136
4.3.3.2. Procedimiento optimizado.....	137

4.3.4. Reducción del nitroindazol 35 . Síntesis de 6-amino-1-(2,6-diclorobencil)-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1 <i>H</i> -indazol (36)	138
4.3.4.1. Procedimiento descrito	138
4.3.4.2. Procedimiento optimizado.....	138
4.3.5. Síntesis del dipéptido 3,4-di(F)-Phe-Dab(Boc)-NHBn (41)	139
4.3.6. Síntesis de la urea 42	140
4.3.6.1. Procedimiento descrito	140
4.3.6.2. Procedimiento optimizado.....	140
4.3.7. <i>N</i> -Boc desprotección de la urea 42 . Obtención del producto RWJ-58259 (3)	141
4.4. SÍNTESIS DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE Gly	143
4.4.1. Producto de partida no comercial. Síntesis de <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-L-fenilalaninal (Boc-Phe-H) (47).....	143
4.4.2. Síntesis de pseudipéptidos Boc-PheΨ[(<i>RS</i>)CH(CN)NH]Gly-OMe [(<i>RS</i>)- 50]	144
4.4.3. Síntesis de (4 <i>S</i> ,5 <i>RS</i>)-5-ciano-4-fenilmetil-1-(metoxycarbonilmetil)-2-oxoimidazolidina [(<i>RS</i>)- 51]	145
4.4.4. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 53].....	146
4.4.5. <i>N</i> -alquilación de las 2-oxopiperazinas (<i>RS</i>)- 53 . Síntesis de (5 <i>RS</i>)-4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 57] y (5 <i>RS</i>)-1,4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 58].....	147
4.4.6. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-1-bencil-4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 59]	148
4.4.7. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-4-bencilaminocarbonil-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 60]	149
4.4.8. Síntesis de (8 <i>aRS</i>)-(1 <i>S</i>)-1-bencil-3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5- <i>a</i>]pirazina [(<i>RS</i>)- 61]	149
4.4.8.1. A partir de las 2-oxopiperazinas (<i>RS</i>)- 53	149

4.4.8.2. A partir de (4 <i>S</i> ,5 <i>RS</i>)-5-ciano-4-fenilmetil-1-(metoxicarbonilmetil)-2-oxoimidazolidina [(<i>RS</i>)- 51]	150
4.4.9. <i>N</i> -Boc-protección de las 2-oxopiperazinas 53 . Síntesis de (5 <i>RS</i>)-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-1-(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 62] y (5 <i>RS</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonil-5-[(1 <i>S</i>)-1-di(<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 63]	150
4.4.10. <i>N</i> -Z-protección de las 2-oxopiperazinas 53 . Síntesis de (5 <i>RS</i>)-4-benciloxycarbonil-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 64]	151
4.4.11. Procedimiento general de síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en N ₁ . Método A	151
4.4.11.1. Formación de las α -aminobencilamidas 70a,b a partir de los α -aminoácidos <i>N</i> _{α} -Fmoc protegidos 69a,b	151
4.4.11.2. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Fmoc. Síntesis de 71a,b	152
4.4.11.3. Eliminación del grupo protector Boc de (<i>RS</i>)- 57 y reacción con isocianato de bencilo. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1 <i>S</i>)-1-(3-bencilureido)-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 66] y (9 <i>aRS</i>)-(1 <i>S</i>)-1-bencil-3,7-dioxooctahidro-1 <i>H</i> -pirazino[1,2- <i>a</i>]pirazina [(<i>RS</i>)- 67]	152
4.4.11.4. Síntesis de (9 <i>aRS</i>)-(1 <i>S</i>)-1-bencil-3,7-dioxooctahidro-1 <i>H</i> -pirazino[1,2- <i>a</i>]pirazina [(<i>RS</i>)- 67]	154
4.4.11.5. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-5-[(1 <i>S</i>)-1-(3-bencilureido)-2-feniletil]-4-(2-carboximetil)-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)- 68]	154
4.4.11.6. Procedimiento general para la síntesis de ureas pseudotripeptídicas (<i>R</i>)- 72a,b	155
4.4.12. Procedimiento general de síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en N ₁ . Método B	157
4.4.12.1. Productos de partida no comerciales. Formación de las α -aminobencilamidas 75a,b a partir de los α -aminoácidos <i>N</i> _{α} -Boc protegidos 74a,b	157

4.4.12.2. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>terc</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-4-(2-carboximetil)-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)-73]	157
4.4.12.3. Síntesis de derivados de 2-oxopiperazinas pseudotripeptídicos (<i>RS</i>)-76a,b	158
4.4.12.4. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Boc. Síntesis de (<i>RS</i>)-77a,b	158
4.4.12.5. Síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas 78a,b y 79a,b	159
4.4.12.6. Procedimiento general de eliminación del grupo Z. Síntesis de 80a,b y 81a,b	159
4.4.13. Síntesis de ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas	160
4.4.13.1. Formación de Fmoc-Arg(Pbf)-NHBN a partir de Fmoc-Arg(Pbf)-OH.	160
4.4.13.2. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Fmoc. Síntesis de H-Arg(Pbf)-NHBN (75c)	160
4.4.13.3. Síntesis de (5 <i>RS</i>)-1-bencil-5-[(1 <i>S</i>)-1- <i>terc</i> -butoxicarbonilamino-2-feniletil]-4-(2-carboximetil)-2-oxopiperazina [(<i>RS</i>)-82]	161
4.4.13.4. Síntesis de los derivados pseudotripeptídicos de 1-bencil-2-oxopiperazina (<i>RS</i>)-83a-c	161
4.4.13.5. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Boc. Síntesis de (<i>RS</i>)-84a-c	162
4.4.13.6. Síntesis de las ureas (<i>RS</i>)-85a-c y (<i>RS</i>)-86a,b	162
4.4.13.7. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Z. Síntesis de (<i>RS</i>)-87a,b y (<i>RS</i>)-88a,b	163
4.4.13.8. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Pbf. Síntesis de (<i>RS</i>)-87c	163
4.4.13.9. Síntesis de (9a <i>RS</i>)-(1 <i>S</i>)-1,8-bencil-3,7-dioxooctahidro-1 <i>H</i> -pirazino[1,2- <i>a</i>]-pirazina [(<i>RS</i>)-89]	164
4.4.14. Síntesis de ureas análogas del antagonista de PAR1 de referencia RWJ-58259 (<i>RS</i>)-90b,c y (<i>RS</i>)-91b,c	164

4.5. SÍNTESIS DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS	167
4.5.1. Producto de partida no comercial. Síntesis de <i>N,N'</i> -(di- <i>terc</i> -butoxicarbonil)-L-triptofanal [Boc-Trp(Boc)-H] (92)	167
4.5.2. Procedimiento general de síntesis de los pseudipéptidos Boc-XaaΨ [(<i>RS</i>)CH(CN)NH]Yaa-OMe (RS)- 94c y - 95b,c	168
4.5.3. Procedimiento general de síntesis de las 2-oxopiperazinas 96c y 97b,c	169
4.5.4. Procedimiento general de síntesis de las 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5- <i>a</i>]pirazinas 98c y 99c	169
4.5.5. Procedimiento general de <i>N</i> -alquilación en posición N ₄	170
4.5.5.1. Síntesis de 2-oxopiperazinas benciladas en posición N ₄ 100c y 101b,c ..	170
4.5.5.2. Síntesis de 2-oxopiperazinas portadoras del grupo <i>terc</i> -butoxicarbonilmetilo en posición N ₄ 102c y 103b,c	170
4.5.6. Procedimiento general de <i>N</i> -alquilación con BnBr en posición N ₁ y grupo guanidino de las 2-oxopiperazinas derivadas de Arg(Pbf) 100c-103c . Síntesis de 104c , 106c , 107c , 109c y 110c-113c	171
4.5.7. Procedimiento general de <i>N</i> -alquilación en posición N ₁ de las 2-oxopiperazinas derivadas de Lys(Boc) 101b y 103b . Síntesis de 107b y 112b	172
4.5.8. Procedimiento general de síntesis de bencilureas derivadas de 1,4-bencil-2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de Arg 114c y 115c	172
4.5.9. Procedimiento general de síntesis de las 8-bencil-3,7-dioxooctahidro-1 <i>H</i> -pirazino[1,2- <i>a</i>]pirazinas 116c y 117c	173
4.6. EVALUACIÓN BIOLÓGICA	175
4.6.1. Ensayo de inhibición de agregación plaquetaria	175
4.6.2. Evaluación de la actividad antitumoral. Ensayo de citotoxicidad	176
4.7. ANEXO III: TABLAS DE DATOS ANALÍTICOS Y ESPECTROSCÓPICOS ..	177
5. BIBLIOGRAFÍA	219

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se han utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides”, *Pure & Appl. Chem.* **1994**, 56, 595-674. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/iubmb.html#03>).

Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de símbolos de una o tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido, mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de numeración inglesa, en esta Memoria se utiliza este sistema. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, habiendo sido aceptado este sistema por la Real Academia Española de la Lengua, como se recoge en el Diccionario Panhispánico de Dudas, desde su primera edición en octubre de 2005.

Hay terminología científico-técnica que frecuentemente se utiliza de forma abreviada, pero para la cual en la versión en español no existe o no se utiliza una abreviatura, en estos casos se ha utilizado la abreviatura inglesa.

ABREVIATURAS

AC	Adenilato Ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ang	(del inglés: Angiopoietin) = Angiopoyetina
APC	(del inglés: Activated Protein C) = Proteína Activada C
BACE-1	Beta-secretasa 1
BEMP	2- <i>terc</i> -Butilimino-2-etilamino-1,3-dimetilperhidro-1,2,3-diazafosforina
bFGF	(del inglés: Basic Fibroblast Growth Factor) = Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BTPP	<i>Terc</i> -butilimino-tri(pirrolidin)fosforano
CAM	(del inglés: ChorioAllantoic Membrane) = Membranas corioalantoicas
c-AMP	(del inglés: cyclic Adenosine Monophosphate) = Adenosina monofosfato cíclico
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
COSY	(del inglés: COrrrelation SpectroscopY)
Dab	Acido diaminobutírico
DAG	Diacilglicerol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina

DMF	Dimetilformamida
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido-d ₆
DOS	(del inglés: Diversity Oriented Synthesis) = Síntesis orientada a la diversidad
EC₅₀	Concentración efectiva 50
ECL	(del inglés: Extracellular Loop) = Bucle extracelular
EGF	(del inglés: Epidermal Growth Factor) = Factor de crecimiento del endotelio vascular
EGFR	(del inglés: Epidermal Growth Factor Receptor) = Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
Egr	(del inglés: Early Growth Response) = Respuesta temprana de crecimiento
ELISA	(del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) = Ensayo de inmunosorbente unido a enzima
EP	Embolia Pulmonar
EPCR	(del inglés: Endothelial Protein C Receptor) = Receptor de la proteína C endotelial
EPO	Entidad Promotora Observadora
eq.	Equivalentes
ERAs	Elementos de Respuesta a Andrógenos
ERK	(del inglés: Extracellular Regulated Kinase) = Quinasa extracelular regulada
ESI-MS	(del inglés: Electrospray ionization mass spectrometry) = Espectrometría de masas por ionización con electrospray
FIX	Factor IX
FIXa	Factor IXa
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
FV	Factor V
FVII	Factor VII
FVIIa	Factor VIIa
FVIII	Factor VIII
FX	Factor X
FXa	Factor Xa
FXI	Factor XI
FXIa	Factor XIa
GDP	Guanosina Difosfato

GEFs	(del inglés: Guanine-nucleotide Exchange Factors) = Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCRs	(del inglés: G-Protein Coupled Receptors) = Receptores acoplados a proteínas G
GRK	(del inglés: G protein Receptor Kinase) = Quinasa de receptores acoplados a proteína G
GRO-α	(del inglés: Growth Regulated Oncogen- α) = Oncogén regulador de crecimiento α
GTP	Guanosina Trifosfato
HBTU	N,N,N',N'-tetrametiluroniohexafluorofosfato-O-benzotriazol
HER2	(del inglés: Human Epidermal growth factor Receptor 2) = Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
HMBC	(del inglés: Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
hPAR1	(del inglés: Human Protesase-Activated Receptor 1) = Receptor activado por proteasa humano 1
HPLC	(del inglés: High-Performance Liquid Chromatography) = Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPLC-MS	(del inglés: High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) = Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas
HSQC	(del inglés: Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HTS	(del inglés: High Troughput Screening) = Cribado de alto rendimiento
InsP₃	Fosfoinosítido
KDR	Receptor de factor de crecimiento del endotelio vacular 2
Ki	Canal de Potasio
K_i	Constante de disociación
KLK	(del inglés: Kallikrein-Related Peptidases) = Peptidasas relacionadas con las kalikreinas
LBS	(del inglés: Ligand Binding Site) = Sitio de unión del ligando
LMWH	(del inglés: Low-Molecular Weight Heparin) = Heparinas de bajo peso

	molecular
MAPKs	(del inglés: Mitogen-Activated Protein Kinases) = Proteína quinasas activadas por mitógenos
MMP-1	(del inglés: Matrix Metalloprotease-1) = Metaloproteasa de matriz 1
MS	(del inglés: Mass spectrometry) = Espectrometría de masas
MW	(del inglés: MicroWaves) = Microondas
NOE	(del inglés: Nuclear Overhauser Effect) = Efecto nuclear Overhauser
NOESY	(del inglés: Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) = Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser
Orn	Ornitina
P	Grupo protector
PAR1-APs	(del inglés: PAR1-Activating Peptides) = Péptidos activadores de PAR1
PARs	(del inglés: Protease-Activated Receptors) = Receptores activados por Proteasas
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PDGF	(del inglés: Platelet-Derived Growth Factor) = Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pf	Punto de fusión
PI₃K	(del inglés: Phosphatidylinositol-3-Kinase) = Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKC	Proteína Quinasa C
PLCβ	(del inglés: Phospholipase C β) = Fosfolipasa C β
ppm	Partes por millón
PyK2	(del inglés: Proline rich tyrosin Kinase-2) = Tirosina quinasa rica en prolinas-2
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROK	(del inglés: Rho-Kinase) = Rho-quinasa
Rdto.	Rendimiento
SAR	(del inglés: Structure-Activity Relationships) = Relaciones Estructura-Actividad
SER	(del inglés: Serum Response Elements) = Elementos de Respuesta Sérica
Src	Steroid receptor cofactor
t.a.	Temperatura ambiente

TEA	Trietilamina
TF	(del inglés: Tissue Factor) = Factor Tisular
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIE	Receptor de Angiopoyetina
TIS	Triisopropilsilano
TK	(del inglés: Tyrosin Kinase) = Tirosina quinasa
TLC	(del inglés: Thin Layer Chromatography) = Cromatografía de capa fina
TM	Transmembrana
TMSCN	Cianuro de trimetilsililo
t_R	Tiempo de retención
VEGF	(del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor) = Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR2	(del inglés: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) = Receptor 2 del Factor de crecimiento del endotelio vascular

ANEXO I: AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código		Fórmula	Aminoácido	Código		Fórmula
Ácido Aspártico	Asp	D		Isoleucina	Ile	I	
Ácido Glutámico	Glu	E		Leucina	Leu	L	
Alanina	Ala	A		Lisina	Lys	K	
Arginina	Arg	R		Metionina	Met	M	
Asparagina	Asn	N		Prolina	Pro	P	
Cisteína	Cys	C		Serina	Ser	S	
Glutamina	Gln	Q		Tirosina	Tyr	Y	
Glicina	Gly	G		Treonina	Thr	T	
Fenilalanina	Phe	F		Triptófano	Trp	W	
Histidina	His	H		Valina	Val	V	

ANEXO II: GRUPOS PROTECTORES DE AMINOÁCIDOS

PROTECTOR DE α -NH ₂		PROTECTOR DE α -CO ₂ H		PROTECTOR DE AMINOÁCIDOS BÁSICO		
Abrev.	Fórmula	Abrev.	Fórmula		Abrev.	Fórmula
Alloc		2-Cl-Trt		NH ₂ de Lys y Orn	Boc	
Boc		Al			Cl-Z	
Bpoc		Bn			Fmoc	
Ddz		DMB			Z	
Fmoc		Fm			Msc	
Nsc		Me			Mtt	
Pms		pNB		NH-C(=NH)-NH ₂ de Arg	MIS	
Z		^t Bu			Pbf	
Nps		Cam			Pmc	
Trt		TMSE			TOS	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Trombina: Una enzima esencial en homeostasis

La trombina es una serina proteasa que, tal como se muestra de forma esquemática en la Figura 1.1, posee un papel central y esencial en la cascada de coagulación sanguínea¹. Además, esta proteasa induce diversos efectos sobre una amplia variedad de células, tales como plaquetas^{2,3}, células endoteliales y de músculo liso²⁻⁴, neuronas y astrocitos en el sistema nervioso^{2,4-7}, células inmunitarias e inflamatorias^{8,9}, osteoblastos¹⁰ y células tumorales¹¹⁻¹⁴. Estos efectos celulares de la trombina están mediados por la activación de tres receptores de la familia de receptores activados por proteasas (PARs: PAR1, PAR3 y PAR4)^{2,4,15,16}. Éstos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que requieren una proteólisis específica en el extremo N-terminal extracelular para desenmascarar en este extremo una secuencia de activación intramolecular. Esta activación se traduce en una compleja cascada de señalización intracelular. Entre estos receptores, PAR1 es el principal receptor activado por trombina en la mayoría de las células humanas¹⁷.

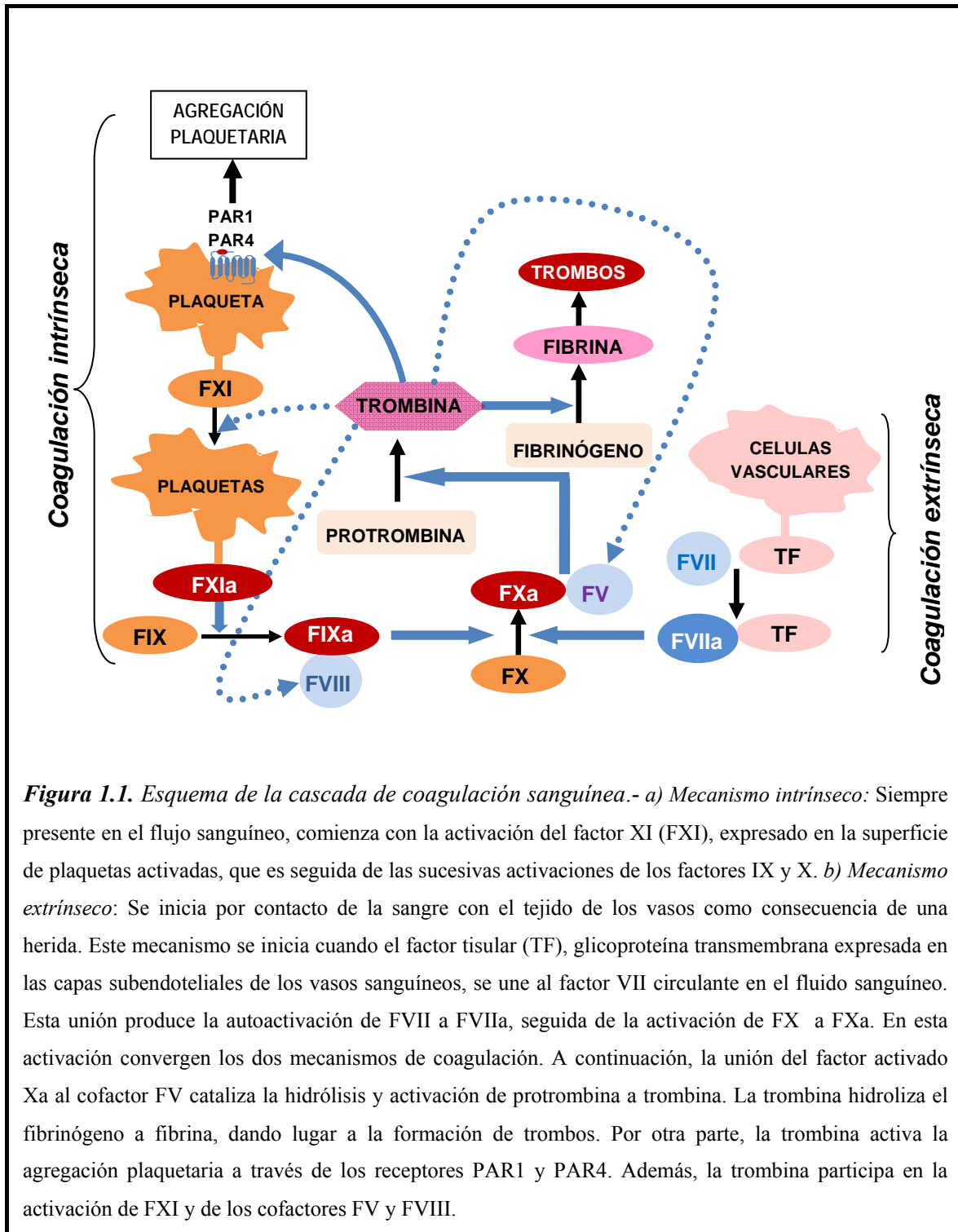


Figura 1.1. Esquema de la cascada de coagulación sanguínea.- a) *Mecanismo intrínseco*: Siempre presente en el flujo sanguíneo, comienza con la activación del factor XI (FXI), expresado en la superficie de plaquetas activadas, que es seguida de las sucesivas activaciones de los factores IX y X. b) *Mecanismo extrínseco*: Se inicia por contacto de la sangre con el tejido de los vasos como consecuencia de una herida. Este mecanismo se inicia cuando el factor tisular (TF), glicoproteína transmembrana expresada en las capas subendoteliales de los vasos sanguíneos, se une al factor VII circulante en el fluido sanguíneo. Esta unión produce la autoactivación de FVII a FVIIa, seguida de la activación de FX a FXa. En esta activación convergen los dos mecanismos de coagulación. A continuación, la unión del factor activado Xa al cofactor FV cataliza la hidrólisis y activación de protrombina a trombina. La trombina hidroliza el fibrinógeno a fibrina, dando lugar a la formación de trombos. Por otra parte, la trombina activa la agregación plaquetaria a través de los receptores PAR1 y PAR4. Además, la trombina participa en la activación de FXI y de los cofactores FV y FVIII.

1.1.2. Receptor de trombina PAR1: Estructura primaria, especificidad, activación, señalización y desensibilización

PAR1 fue el primer receptor activado por proteasas en ser descubierto y clonado (1991), como resultado de la búsqueda de receptores responsables de los efectos celulares de la trombina¹⁸. La trombina es un agonista extremadamente potente de este receptor ($EC_{50} = 50$ pM) y la activación es bloqueada por los inhibidores de trombina hirudina e hirugen¹⁸. PAR1 está constituido por 425 aminoácidos y posee 7 dominios hidrófobos transmembrana característicos de los GPCR. Tal como se indica de forma esquemática en la Figura 1.2, este receptor contiene en el extremo N-terminal extracelular la secuencia consenso de reconocimiento para la proteólisis por serina proteasas ($L^{38}DPR^{41}$), seguida de la secuencia activadora ($S^{42}FLLRN^{47}$) y de una secuencia similar a la secuencia de reconocimiento de la hirudina por trombina ($K^{51}YEPF^{55}$). Esta secuencia similar a hirudina es esencial para la unión del receptor con alta afinidad a trombina¹⁷.

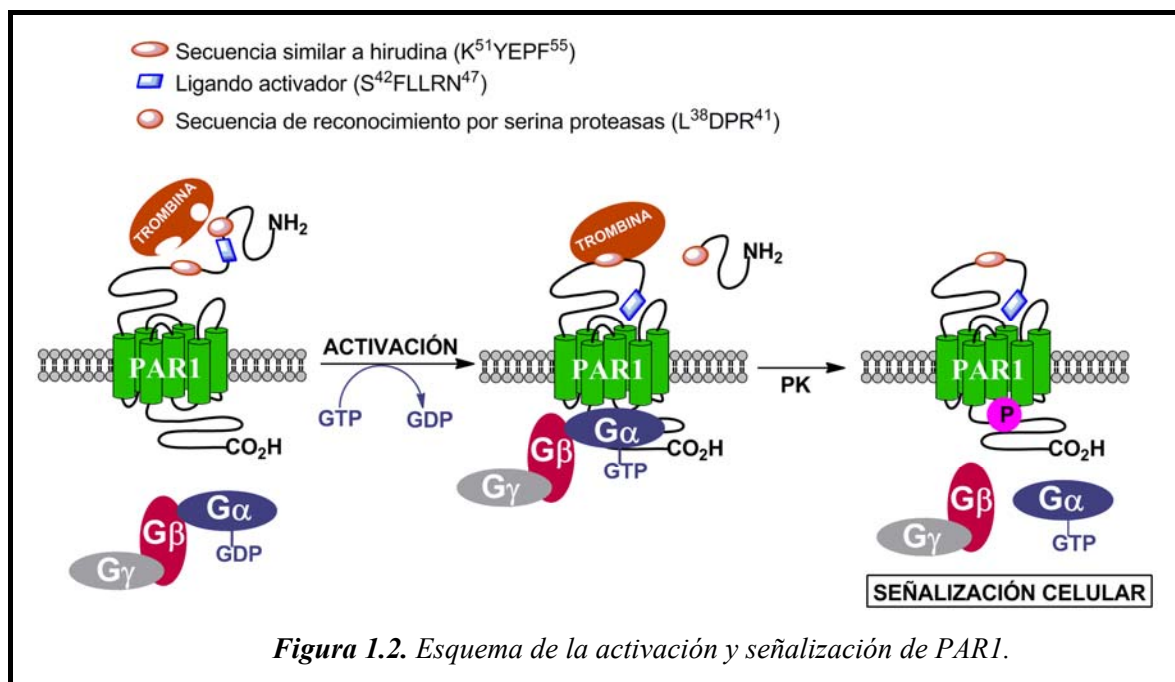


Figura 1.2. Esquema de la activación y señalización de PAR1.

Una vez efectuada la proteólisis del receptor, tanto éste como la trombina, manteniéndose unidos, sufren un cambio conformacional para facilitar la unión intramolecular del ligando activador desenmascarado al denominado sitio de unión ($L^{84}PAFIS^{89}$), localizado también en el exodominio N-terminal, y al segundo bucle extracelular del receptor^{19,20}. Esta activación favorece la interacción del receptor con las

proteínas G y la subsiguiente activación de la compleja cascada de señalización celular. Tomando como modelo la secuencia activadora ($S^{42}FLLRN^{47}$), se han sintetizado péptidos análogos que activan el receptor sin necesidad de proteólisis, denominados péptidos activadores de PAR1 (abreviado en inglés como PAR1-APs). El pentapéptido SFLLR es la mínima secuencia necesaria para actividad agonista completa, aunque, en general estos PAR1-APs muestran potencias ($EC_{50} < 1 \mu M$) significativamente inferiores a la trombina y baja selectividad con respecto a otros PARs^{2,4}.

Aunque diferentes especies animales comparten alta homología de secuencia para cada tipo de PAR, hay diferencias a nivel de la secuencia activadora. Por ejemplo, para PAR1, la secuencia activadora en humanos es SFLLRN, mientras que en roedores es SFLLRN²¹. Estas diferencias de secuencia determinan las afinidades de sus respectivos PAR1-APs. Como estos péptidos activadores se usan habitualmente como agonistas de referencia en estudios farmacológicos, hay que tenerlo en cuenta a la hora de escoger el PAR1-AP apropiado, dependiendo de la especie animal de estudio. Por otra parte, los PARs también presentan especificidad, según la especie animal, en su expresión celular y perfiles de señalización²². Así por ejemplo, en lo que respecta a las plaquetas, células en las que los PARs han sido más estudiados, las plaquetas humanas expresan PAR1 y PAR4, con señalización independiente, mientras que, las plaquetas de ratón expresan PAR3 y PAR4, y las de cobaya PAR1, PAR3 y PAR4^{17,21}. Hay que destacar que las plaquetas de los animales más habituales de evaluación biológica, ratones, ratas y perros no expresan PAR1²³. En células endoteliales de ratón PAR1 y PAR4 median la señalización. Sin embargo, en las células endoteliales humanas PAR1 es el único receptor de trombina, pues no expresan PAR4²⁴. Las células de músculo liso vascular y los fibroblastos expresan PAR1 y PAR2, pero estos últimos no son activados por trombina^{17,21,22}. De forma similar, las neuronas y astrocitos del sistema nervioso central y las neuronas del sistema nervioso periférico, así como diversas células inflamatorias e inmunitarias, expresan PAR1 y PAR2^{2,4,8}. La especificidad de especie animal complica el desarrollo farmacológico de moduladores de estos receptores, pues los ensayos *in vivo* hay que hacerlos en primates.

La trombina es el principal regulador fisiológico de PAR1, sin embargo, otras enzimas de la cascada de coagulación sanguínea también pueden contribuir a su activación. Así, durante la coagulación el complejo TF-FVIIa señala, en parte, a través de PAR1²⁵. Aunque el factor FVIIa por sí solo, incluso a altas concentraciones, no es capaz de activar PAR1, cuando este receptor es coexpresado junto al TF sí que es activado por FVIIa. El

factor FXa también activa PAR1 en células endoteliales y en fibroblastos²⁶. La proteína C activada (APC) por trombina, cuando está unida a su receptor en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (EPCR), también ejerce parte de sus acciones a través de la activación de PAR1²⁷. Mientras la APC se mantiene unida a través de su receptor a la superficie celular, el complejo EPCR-APC induce la activación de PAR1. Esta activación es responsable en gran medida de los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de la APC^{27,28}. Se ha demostrado que la APC hidroliza PAR1 en el mismo sitio que la trombina²⁷. Estudios recientes sugieren que la enzima fibrinolítica plasmina puede actuar como activador endógeno de PAR1 en astrocitos y neuronas^{9,29}. Como se comentara más ampliamente en el siguiente apartado, 1.1.3, diversas proteasas derivadas de tumores, fundamentalmente peptidasas relacionadas con las kalikreinas (KLK)^{9,30} y la metaloproteasa de matriz 1 (MMP-1)³¹, activan PAR1. Este receptor también es activado por algunas proteasas bacterianas, entre las que destacan las gingipainas-R específicas de arginina (HRgpA y RgpB) producidas por la principal bacteria responsable de la periodontitis humana *Porphyromonas gingivallis*. Se ha descrito que HRgpA y RgpB inducen la agregación plaquetaria con potencia similar a la trombina y que sus efectos son mediados por PAR1 y PAR4³². Este mecanismo podría explicar la relación que hay entre la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares³³. Muy recientemente, también se ha descrito que proteasas de promastigotes de *Leishmania* activan PAR1 en macrófagos y que esta activación puede ser responsable de la infección de estas células por *Leishmania*³⁴.

Como en la mayoría de los GPCRs, PAR1 se acopla con multitud de cascadas de señalización celular. La activación de este receptor produce cambios conformacionales que favorecen su interacción con proteínas G triméricas. En estado inactivo una subunidad $G\alpha$ está unida a guanosina difosfato (GDP) y a las subunidades $G\beta\gamma$. La activación de PAR1 induce un cambio conformacional en estas proteínas G que conlleva el intercambio de GDP por guanosina trifosfato (GTP), seguido de la fosforilación del receptor y separación de la subunidad $G\alpha$ del complejo dimérico $G\beta\gamma$, desencadenando la compleja cascada de señalización (Figura 1.2), específica según el tipo de célula. PAR1 interacciona con distintos subtipos de subunidades $G\alpha$ ^{2,4,15,22}, principalmente, con $G\alpha_i$, $G\alpha_{12/13}$ y $G\alpha_q$ (Figura 1.3). El acoplamiento con $G\alpha_i$ inhibe adenilato ciclasa (AC), suprimiendo la formación de c-AMP, acción que provoca las respuestas de las plaquetas¹⁵.

El acoplamiento de PAR1 con $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ juega un papel fundamental en el control de la forma celular y la migración⁴. Estas subunidades interaccionan con factores de

intercambio de nucleótidos de guanina Rho (GEFs)³⁵⁻³⁷, que controlan la forma y la migración celular, y con elementos de respuesta sérica (SRE)³⁸. En las plaquetas esta activación de Rho-quinasas mediada por $G\alpha_{12/13}$ está involucrada en los cambios de forma inducidos por trombina³⁹, mientras que, en fibroblastos y células endoteliales parece estar involucrada en la permeabilidad y en la migración^{36,37,40}. En células tumorales la activación de Rho kinasas mediada por PAR1 parece estar involucrada en la reorganización del citoesqueleto, la migración celular y la invasión^{35,41,42}.

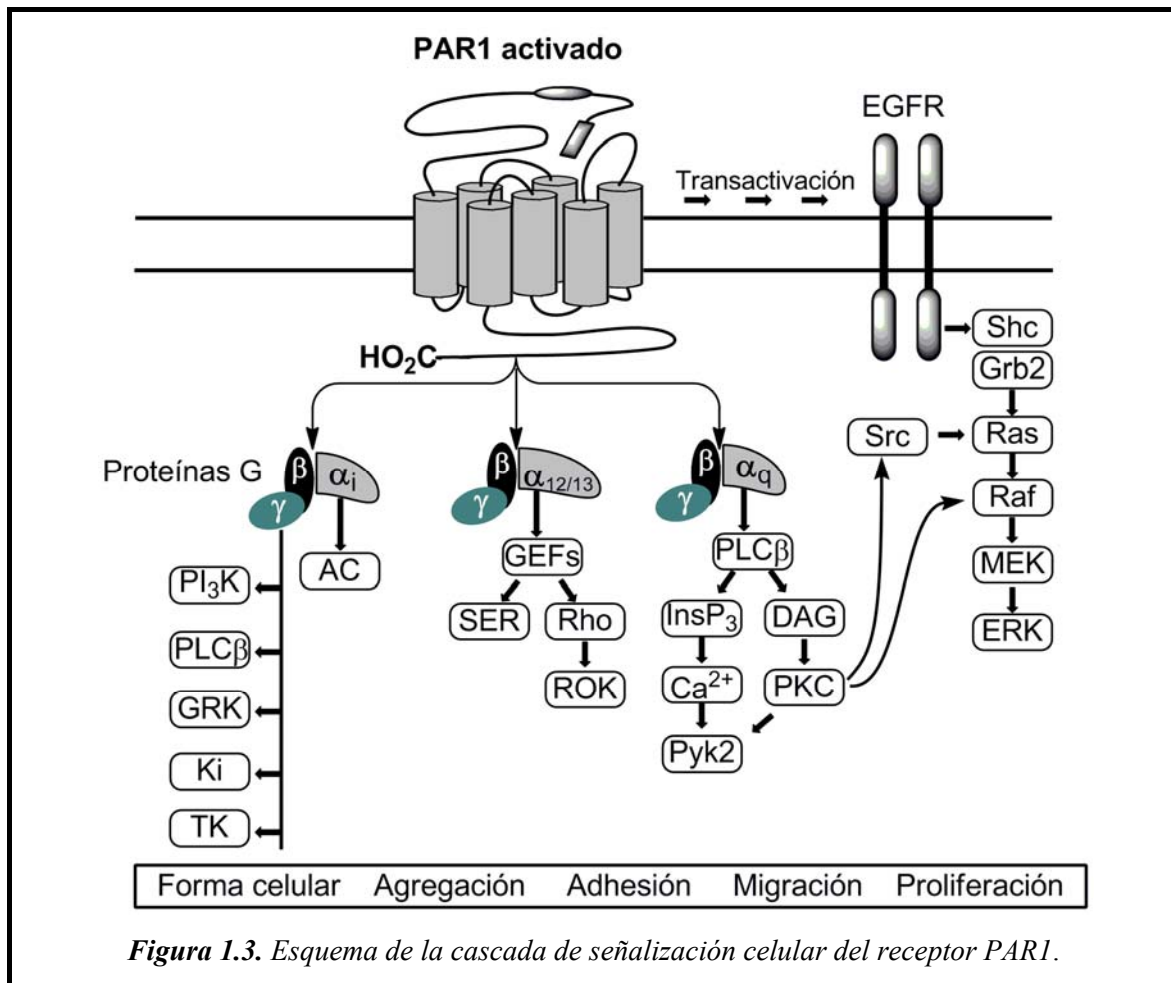


Figura 1.3. Esquema de la cascada de señalización celular del receptor PAR1.

El principal acoplamiento de PAR1 con proteínas G es a través $G\alpha_q$ ^{4,36}. Este acoplamiento activa la fosfolipasa Cβ (PLCβ)⁴³, generando fosfoinosítido ($InsP_3$), que induce movilización de calcio, y diacilglicerol (DAG), que activa la proteína quinasa C (PKC). Este mecanismo abre el camino a kinasas reguladas por calcio y por PKC, tales como las proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y fosfoesterasas⁴⁴. Teniendo en cuenta el importante efecto mitógeno de la trombina, ha habido mucho interés en el

acoplamiento de PAR1 con la cascada de MAP kinasas^{2,4}. En particular, el módulo MAPK-ERK1/2 juega un papel crítico en proliferación celular y diferenciación. Gran parte de la información sobre la regulación de este módulo se ha derivado del estudio de receptores tirosina kinasa, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La activación de este receptor inicia la cascada de fosforilación desde la proteína Ras a ERK1/2. Esta cascada puede ser activada vía PKC⁴⁵ o mediante la transactivación de EGFR inducida por PAR1^{4,44,46,47}.

Por último, tal como se muestra en la Figura 1.3, las subunidades G $\beta\gamma$ acoplan los receptores PAR1 a muchas otras ramas de señalización^{4,15,48}, que incluyen fosfatidilinositol-3-kinasa (PI₃K), enzimas modificadoras de lípidos (PLC β), kinasas de receptores de proteínas G (GRK), canales de potasio (Ki), y tirosina kinasas (TK). Entre estas vías de señalización, destaca el papel importante que juega la PI₃K en la regulación de la estructura del citoesqueleto, la movilidad y supervivencia celulares y la mitogénesis mediada por PAR1. Además, en algunos tipos de células la PI₃K funciona como intermediaria en la activación de ERKs^{2,15,43,49}.

Debido a la naturaleza irreversible de la activación proteolítica de PAR1, su señalización está estrechamente regulada por su rápida desensibilización y tráfico⁵⁰. La activación irreversible de estos receptores sugiere que poseen un mecanismo de terminación de la señalización diferente al de los clásicos GPCRs². La fosforilación es importante para su desensibilización e internalización. Así, la fosforilación en diversas posiciones del extremo C-terminal intracelular mediante las kinasas de GPCRs 3 y 5 median la rápida inactivación⁵¹. Además, la unión de β -arrestinas independiente de la fosforilación también contribuye a la desensibilización de PAR1⁵². Estos receptores cuando están activados son fosforilados, desacoplados de las proteínas G y, preferentemente, internalizados en lisosomas, donde son degradados con alta eficacia, sin ser reciclados a la superficie celular^{53,54}. La internalización desconecta el receptor de la señalización, mientras que, la degradación en lisosomas impide el retorno a la superficie celular. Los receptores PAR1 no activados son reciclados entre la superficie celular y un compartimento intracelular, generando una reserva protegida de receptores, que renueva la superficie celular tras la exposición a la acción de la proteasa activadora, dando lugar a una rápida resensibilización, independiente de la síntesis *de novo* del receptor²². Además, la desensibilización del receptor puede tener lugar también por proteólisis extracelular a nivel de la secuencia activadora² (S⁴²FLLRN⁴⁷).

1.1.3. PAR1 en cáncer y angiogénesis

1.1.3.1. Asociación hipercoagulación-cáncer

La relación entre cáncer y trombosis es bien conocida desde 1865⁵⁵. Así, las trombosis venosas, cuyas manifestaciones clínicas varían desde la trombosis de venas profundas a la embolia pulmonar (EP), son frecuentemente observadas en pacientes de cáncer. Se estima que 10-20 % de las muertes por cáncer pueden ser debidas a EP más que al propio cáncer⁵⁶ y que la histología del tumor está relacionada con el riesgo de sufrir EP⁵⁷. Las trombosis venosas son la segunda causa de muerte en pacientes de cáncer⁵⁸. Por otra parte, el cáncer es un reconocido factor de riesgo de tromboembolismo venoso y pacientes de cáncer sometidos a cirugía tienen mayor riesgo de trombosis posquirúrgica⁵⁹. La trombosis puede ser la primera manifestación clínica de un cáncer. De hecho, se ha visto que, aproximadamente el 10% de los pacientes que sufren una trombosis espontánea, desarrollan cáncer unos años más tarde⁶⁰. Además, la prognosis de los pacientes de cáncer es peor en los que desarrollan trombosis^{61,62}. Teniendo en cuenta estos hechos, se han realizado diversos estudios clínicos prospectivos sobre el uso de anticoagulantes en pacientes de cáncer, cuyos resultados sugieren un potencial aumento en su supervivencia^{55,59,63,64}. En estos estudios se ha comparado la heparina o la warfarina frente a heparinas de bajo peso molecular (LMWH)⁶⁵⁻⁶⁸, encontrando mayores aumentos de supervivencia en los pacientes tratados con LMWH^{69,70}. Además de aumentar supervivencia, se ha descrito que estos anticoagulantes en pacientes de cáncer son capaces de aumentar la actividad funcional de las células asesinas naturales⁷¹.

1.1.3.2. Sobreexpresión de PAR1 en cáncer

La asociación entre expresión de PAR1 y cáncer es bien conocida para un número creciente de tumores^{13,72}. Así, se ha observado sobreexpresión de PAR1 en biopsias de tumores de pacientes de melanoma⁷³, carcinoma de endometrio⁷⁴, cáncer de mama⁷⁵, próstata⁷⁶⁻⁷⁹, páncreas⁸⁰, ovario⁸¹, colon⁸² y de pulmón de células no pequeñas^{83,84}, carcinoma de cabeza y cuello con células escamosas⁸⁵ y de leucemias⁸⁶. En muchos de estos pacientes, los niveles de expresión de PAR1 correlacionan con el grado de

invasividad del tumor. Así, por ejemplo, un estudio en un panel de líneas celulares de carcinoma de mama mostró altos niveles de expresión del gen *hPar1* en células altamente agresivas metastásicas (MDA-435 o MCF10AT3B), niveles intermedios de expresión en células moderadamente metastásicas (MDA-231 o MCF10T) y niveles muy bajos de expresión o nulos en células no metastásicas (MCF-7, ZR-75 o MCF10A)⁷⁵. De forma similar, se ha visto que la expresión de PAR1 está significativamente aumentada en fibroblastos de tejidos de mama malignos con respecto a fibroblastos de tejidos benignos⁸⁷. La expresión de PAR1 es un factor independiente de la prognosis de reducción de supervivencia y se ha demostrado que es un factor de riesgo para la recurrencia en el cáncer de próstata⁷⁷.

Estudios experimentales en modelos animales y líneas celulares de cáncer también apoyan la estrecha relación entre la expresión de PAR1 y cáncer. Así, por ejemplo, PAR1 induce la transformación oncogénica de fibroblastos NIH 3T3⁸⁸ y el bloqueo de la expresión de PAR1 en células metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231 reduce considerablemente su potencial metastásico, mientras que, la sobreexpresión de PAR1 en células tumorales poco metastásicas MCF-7 induce su crecimiento e invasión en ratones³¹. Resultados similares se han observado en células de melanoma^{89,90}.

1.1.3.3. Activación y señalización de PAR1 relacionadas con cáncer

Como se ha comentado en el apartado 1.1.2, la trombina es el principal activador de PAR1, siendo esta activación el principal desencadenante de los efectos mitógenos directos de trombina sobre células tumorales y de efectos indirectos a través de interacciones tumor-plaquetas¹⁴. La activación de las plaquetas induce la liberación de factores de crecimiento y angiogénesis de células tumorales, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)⁹¹, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)⁹² y la angiopoietina 1⁹³. Por otra parte, además de mediar la adhesión a células endoteliales y el desarrollo de vasos colaterales, los agregados de plaquetas protegen a las células tumorales de las células asesinas naturales⁹⁴. Estos agregados embolizan, dando lugar a isquemia⁵. Los trombos de células tumorales producen la extravasación del tumor en el parénquima y neoangiogénesis⁶³.

Además de la trombina, otras proteasas contribuyen a la activación de PAR1 y están involucradas en la supervivencia de células tumorales, motilidad, migración e invasión, al menos, en estudios experimentales *in vitro*. Por ejemplo, recientemente, se ha descrito que la proteína C activada (APC), una serina proteasa implicada fundamentalmente en la regulación de la fisiología vascular, aumenta la invasión y quimiotaxis en células de cáncer de mama, mediante la activación de vías de señalización específicas a través de la activación de PAR1 y de EPCR⁹⁵.

Es bien conocido el importante papel que juegan las metaloproteasas matriciales (MMP) en el crecimiento, invasión y metástasis de tumores malignos⁹⁶. En particular, la expresión de MMP-1 está asociada con una peor prognosis en melanomas, y cánceres de mama, ovario, colorrectal, pancreático y gástrico⁹⁷. La expresión de MMP-1 también está asociada con un aumento de angiogénesis en xenoinjertos modelos de melanoma y tumores de mama y de próstata⁹⁸. Un trabajo reciente sugiere que la actividad angiogénica de la MMP-1 de tumores puede ser debida a la activación de PAR1 expresado en células endoteliales, activación que se transmitiría a través de la vía de señalización Raf/MEK/ERK, contribuyendo de esta forma a la capacidad metastásica de las células cancerosas^{31,99}. Se ha descrito también que la expresión de PAR1 en células de cáncer de mama induce la expresión del factor angiogénico Cyr61. Este factor induce invasión y actúa como molécula señalizadora induciendo la expresión de MMP-1 en fibroblastos estromales vecinos¹⁰⁰. En un cribado de fluidos de pacientes, benignos frente a malignos, se ha identificado una cascada de señalización que indica que la MMP-1 activa PAR1¹⁰¹. Por otra parte, se ha descrito que la MMP-1 activa la señalización MAPKs en células endoteliales vía PAR-1 y que la acción combinada de MMP-1 y trombina es más angiogénica que la de cada una de estas proteasas por separado⁹⁸. Estos resultados sugieren que la MMP-1 podría complementar la acción de la trombina en la angiogénesis y progresión tumoral. La MMP-1 también activa PAR1 en la superficie de las plaquetas¹⁰². Sin embargo, efectúa la proteólisis a nivel de los residuos Asp³⁹-Pro⁴⁰, distinto sitio que la trombina (Arg⁴¹-Ser⁴²). Esta activación induce la señalización de la vía Rho-GTP implicada en el cambio de forma celular y la motilidad, así como en la señalización de las MAPKs.

Como ya se ha comentado en el apartado 1.1.2, la activación de PAR1 puede transactivar EGFR. Así, se ha descrito que la activación de PAR1 por trombina induce transactivación persistente de EGFR y ErbB2/HER2 en carcinoma de mama invasivo, pero

no en células epiteliales mamarias normales⁴⁷ y, en células de cáncer de colon HT-29, la transactivación de EGFR induce proliferación celular¹⁰³.

Varios grupos han observado que la sobreexpresión del gen *hPar1* en glándulas mamarias de ratón aumenta los niveles de expresión de *Wnt-4* y *Wnt-7b*, que están unidos a la estabilización de la β -catenina nuclear^{72,104,105}. Esta estabilización sólo se ha observado en el embarazo y en células epiteliales estabilizadas de líneas tumorales.

Por último, la expresión de PAR1 también ha sido relacionada con factores de transcripción⁷². Por ejemplo, en biopsias de cáncer de próstata se ha encontrado relación entre la expresión del gen *hPar1* con elementos de respuesta a andrógenos (ERAs)¹⁰⁶ y con el gen de respuesta temprana-1 (*Egr-1*)¹⁰⁷, observándose correlación entre el nivel de expresión de estos genes y el tamaño y grado de malignidad del tumor. Por otra parte, el gen supresor de tumores p53 participa en la regulación del nivel de expresión de *hPar1*⁷². Se ha observado que la expresión de *hPar1* es baja en líneas de células cancerosas que expresan p53 normal, mientras que, está sobreexpresado en líneas celulares que no expresan p53 o lo expresan mutado¹⁰⁸.

1.1.3.4. PAR1 y angiogénesis

La trombina es un potente factor angiogénico, cuyo efecto es dependiente de la activación de PAR1 e independiente de la formación de fibrina en la coagulación sanguínea^{14,109,110}. Tanto la trombina como el péptido activador de PAR1 SFLLRNPNDKYEPF aumentan 2-3 veces la neoangiogénesis en membranas corioalantóicas (CAM) de pollo¹¹¹. Esta neoangiogénesis va acompañada de inducción del del mRNA de VEGF y de angiopoyetina-2 (Ang-2) y es inhibida por los inhibidores específicos de angiogénesis KDR-Fc (vs. VEGF) y Tie-2-Fc (vs. Ang-1 y Ang-2), así como por inhibidores de la cascada de señalización de PAR1, tales como inhibidores de PKC, MAPK o PI₃K. La trombina también estimula la angiogénesis en células tumorales mediante la inducción de la producción de VEGF¹⁴. En células endoteliales la trombina induce la expresión del receptor VEGFR2¹¹² y la producción de Ang-2¹¹³ y, en plaquetas, induce la secreción de VEGF⁹² y Ang-1⁹³. Además, parece que la inducción de la angiogénesis tumoral por trombina, vía PAR1, requiere la sobrerregulación del oncogén regulador del crecimiento α (*GRO- α*)¹¹⁴. Por otra parte, se ha descrito que los antagonistas

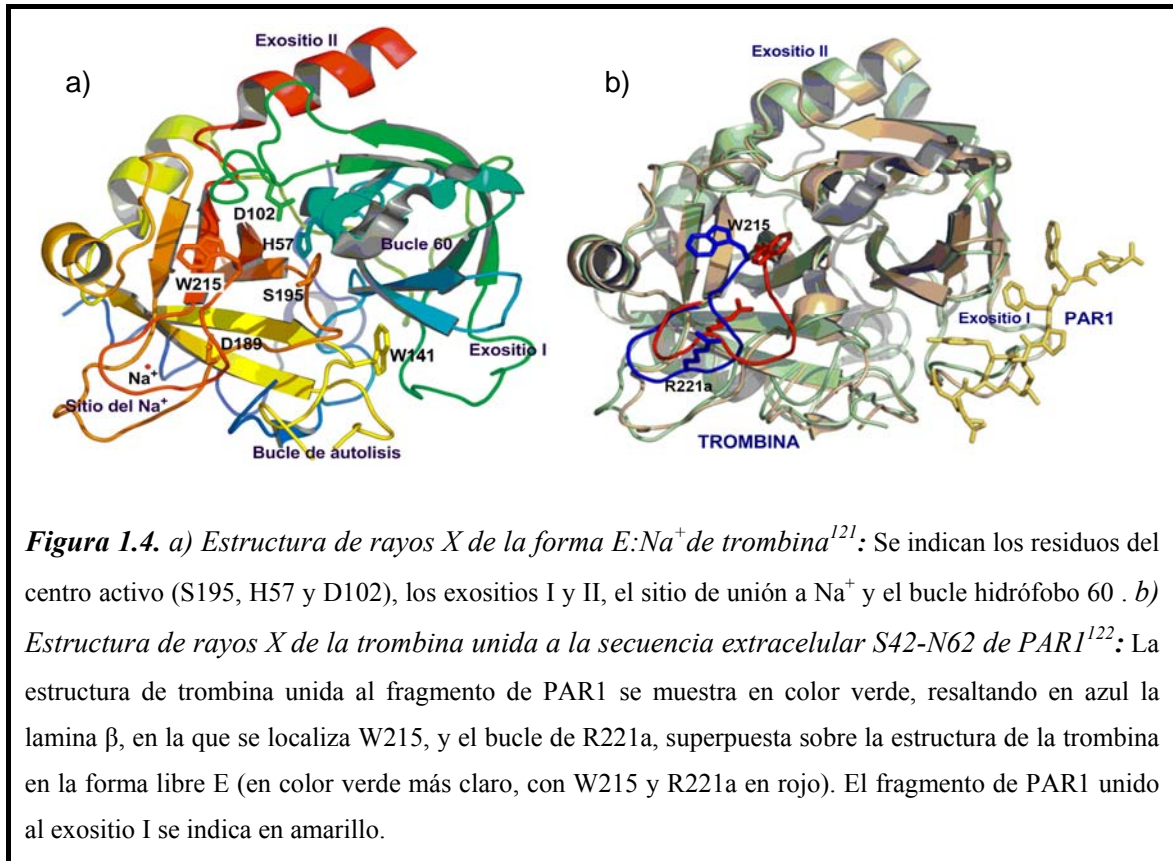
de PAR1 SCH79797 y RWJ-56110 son potentes agentes antiangiogénicos y que este efecto correlaciona con efectos inhibidores sobre la proliferación de células endoteliales y sobre la síntesis de ADN, efectos solo evidentes cuando las células endoteliales se encuentran en estado de crecimiento rápido^{115,116}. Estos antagonistas de PAR1 también inhiben la actividad de ERK1/2 inducida por trombina. Esta inhibición es específica de la activación inducida por trombina, pues los antagonistas de PAR1 no inhiben los efectos sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por bFGF, VEGF o EGF. Por último, recientemente, Zania *et al.* han descrito que el péptido N-terminal PAR1(1-41), que se libera al medio extracelular tras la activación de PAR1 y al que han denominado “parstatin”, muestra potente actividad antiangiogénica *in vitro*¹¹⁷ y en diversos modelos animales¹¹⁸⁻¹²⁰.

1.1.4. Activación de PAR1 por trombina: Estudios estructurales

La trombina posee alta capacidad para adoptar diferentes conformaciones o formas alostéricas. En condiciones fisiológicas es capaz de adoptar tres formas: Una forma inactiva E*, incapaz de unir Na⁺ o sustratos en su sitio activo, que está en equilibrio con una forma activa E, capaz de unir Na⁺, pero no la mayoría de sus sustratos, denominada forma lenta o de baja actividad. Esta forma lenta está, a su vez, en equilibrio con la forma ligada a Na⁺, E:Na⁺ (Figura 1.4a), denominada rápida, altamente activa y necesaria para la unión de la mayoría de sus sustratos fisiológicos, entre los que se encuentra PAR1¹²¹.

En la estructura de trombina se han identificado cuatro sitios esenciales: a) El sitio activo, localizado en un canal interno, donde se sitúan los residuos S195, H57 y D102 (Figura 1.4a), cuya entrada está controlada por la unión de Na⁺, a través del D189; b) El sitio de unión de Na⁺; c) El exosito I, que contiene diversos aminoácidos básicos, que facilitan la orientación óptima de la mayoría de sus sustratos, como el fibrinógeno, la trombomodulina o PAR1, y de sus inhibidores naturales como la hirudina; d) El exosito II, opuesto al exosito I, constituido por una hélice α C-terminal, en el que se unen los ligandos polianiónicos, como la heparina, los glucosaminoglicanos, el receptor de plaquetas GpIb, o los anticuerpos¹²¹. En general, la unión de sustratos al exosito I produce un cambio conformacional a nivel del canal del centro activo, situado a ≈ 30 Å, que se refleja en un cambio en la orientación de las cadenas de W215 y R221 para permitir

la entrada del sustrato en el canal, como se muestra en la Figura 1.4b para la interacción trombina/PAR1.



Al igual que en otros GPCR, la naturaleza transmembrana de PAR1 ha dificultado los estudios estructurales de este receptor. A pesar de ello, en los últimos 10 años, diversos estudios estructurales han aportado información significativa sobre la estructura del receptor y sus interacciones con trombina¹⁷. Esta información se ha obtenido a través de estudios de mutagénesis dirigida, tanto sobre PAR1 como sobre trombina^{18,19,123-130}, de estudios de rayos X sobre trombina humana cristalizada con diversos fragmentos del exodominio N-terminal de PAR1^{122,131,132}, conteniendo todos ellos la secuencia similar a hirudina, y del estudio mediante RMN de la estructura de la secuencia N-terminal de PAR1 (Ala26-Hse103), en comparación con la de la secuencia resultante de proteólisis por trombina (Ser42- Hse103)²⁰. En la Tabla 1 se resume la información resultante de estos estudios agrupada según los distintos dominios estructurales identificados en PAR1.

Tabla 1.1. Aminoácidos relevantes para la interacción trombina/PAR1

	Mutagénesis		Rayos X		RMN
Dominio de PAR1	PAR1	Thrombin	PAR1	Thrombin	PAR1
Reconocimiento por proteasas (L ³⁸ DPR ⁴¹)	L38 P40 R41	L99, I174, W215 S195, H57	L38 D39 L99, I174, W215 H57		
Ligando activador (S ⁴² FLLRN ⁴⁷)	F43 L45 R46	S195, H57 S195, H57 E39			F43, L44, R46
Secuencia similar a hirudina (D ⁵⁰ KYEPF ⁵⁵)	D50 Y52 E53 F55	R73, K149 R67 I82, Y76	D50 Y52 E53 F55	R73, K149 R73, F34 T74, Y76 R67, F34, I82	D50, K51
LBS (L ⁸⁴ PAFIS ⁸⁹)	F87, I88, S89				P85, A86, S89, I88
ECL-2 (Q ²⁴² -----G ²⁶⁵)	D256 E260				
ECL-3 (A ³³⁵ -----E ³⁵⁰)	E347				
Referencias	18,19,123-130		122,131,132		20

En el dominio de reconocimiento de PAR1 por proteasas (L³⁸DPR⁴¹) los estudios de mutagénesis han mostrado que el residuo de R41 es crítico para la activación del receptor¹⁸. Otros estudios indican que L38 y P40 son también importantes para la proteólisis eficiente por trombina¹²⁵. Un modelo 3D de PAR1 unido a trombina muestra que L38 rellena el sitio de unión de grupos aromáticos de trombina, formado por L99, I174 y W215¹²⁴. Uno de los estudios de rayos X confirma esta hipótesis y también indica que la interacción dominante de PAR1 en el sitio activo de trombina es el puente iónico entre el D39 de PAR1 y la H57 de trombina¹³¹.

En lo que respecta al ligando activador (S⁴²FLLRN⁴⁷), los estudios de mutagénesis sugieren la existencia de interacción entre la R46 de PAR1 y el E39 de trombina, a través de un par iónico, y de los residuos de PAR1 F43, L45 y P40 (éste en el sitio de proteólisis) con el W60d, situado en el bucle 60 de trombina, y con los residuos del centro activo S195 e H57¹²⁴. Además, el estudio de RMN indica una fuerte interacción intramolecular de la F43 con la S89 (se observan 8 NOEs) y de la L44 con la I88²⁰. Tanto la S89 como la I88 se localizan en el denominado sitio de unión del ligando activador (L⁸⁴PAFIS⁸⁹). En los

estudios de rayos X la secuencia del ligando activador no se resuelve bien, hecho que se ha relacionado con su alta movilidad¹.

Estudios de mutagénesis sobre el dominio que contiene la secuencia similar a hirudina ($D^{50}KYEPF^{55}$), así como su supresión, indican que la presencia de esta secuencia es esencial para la unión de trombina con alta afinidad¹²⁶. Además, la unión de dicho dominio, como ya se ha comentado, induce efectos alostéricos en trombina, que conllevan un aumento considerable en la eficiencia de la proteólisis^{122-124,126}. Del conjunto de resultados de los estudios de mutagénesis, rayos X y RMN se deduce que los residuos D50, Y52, E53 y F55 establecen interacciones específicas importantes para la unión trombina/PAR1. De ellos, Y52, que interacciona con R73 y F34 de trombina, parece ser especialmente crucial^{20,123,131}. Los estudios de mutagénesis^{124,127} y uno de los estudios de rayos X¹³¹ también destacan la importancia del E53, que establecería un par iónico con la R67 de trombina. Sin embargo, según los estudios de rayos X más recientes^{122,132}, E53 se orientaría hacia fuera de la superficie de trombina (Figura 1.5), interaccionando con T74 y con Y76. Estos estudios muestran también la importancia de la interacción de D50 de PAR1 con R73 y K 149 de trombina, así como la interacción de la F55 de PAR1 con el bolsillo hidrófobo de trombina definido por F34, I82 y L65, y con el residuo básico de R67.

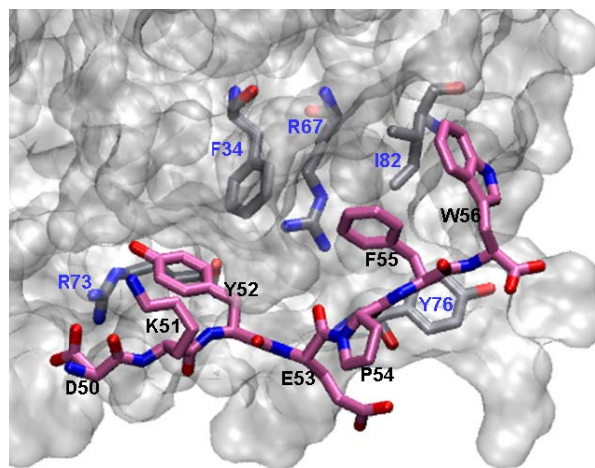


Figura 1.5. Modelo de la estructura de la unión de la secuencia de PAR-1 $D^{50}KYEPFW^{56}$ (símbolos de los aminoácidos en negro) al exosito I de trombina¹²² (residuos implicados en azul).

Mediante la utilización de un anticuerpo policlonal, anti-PAR1(1-160), que inhibe la activación de PAR1 en varios tipos de células que expresan este receptor, y experimentos ELISA se identificó en este receptor la secuencia (L⁸⁴PAFIS⁸⁹), denominada LBS, a la que se une intramolecularmente el ligando activador¹²⁹. Posteriormente, la importancia de esta secuencia fue confirmada en el estudio de RMN ya comentado²⁰. Además de las interacciones comentadas, este estudio identificó interacciones del enlace peptídico D50-K51 con P85 y A86, resultado que sugiere que el ligando activador se extiende hacia la secuencia similar a hirudina. El estudio también sugiere la presencia de un giro en la secuencia activadora a nivel de la R46, de forma que su grupo guanidino se proyectaría hacia fuera del LBS. Por otra parte, uno de los estudios de mutagénesis mostró la importancia de I88 y S89 en el LBS, de E347 en el 3^{er} bucle extracelular (ECL-3) y de D256 en el 2^o bucle extracelular (ECL-2) para las respuestas funcionales a la activación por agonistas (trombina o PAR1-APs)¹⁹. Este estudio muestra también que algunas mutaciones capaces de eliminar la respuesta a PAR1-APs sintéticos tienen poco efecto sobre la activación por trombina. Este resultado sugiere que el sitio de unión de los PAR1-APs no coincide con el sitio de unión intramolecular del ligando activador. En este sentido, hasta el momento, no se ha determinado el sitio de unión de ningún ligando sintético, tanto agonista como antagonista. Sin embargo, se ha observado que agonistas diferentes ejercen diferentes efectos sobre un mismo tipo de célula^{13,133,134}.

1.1.5. Moduladores de PAR1

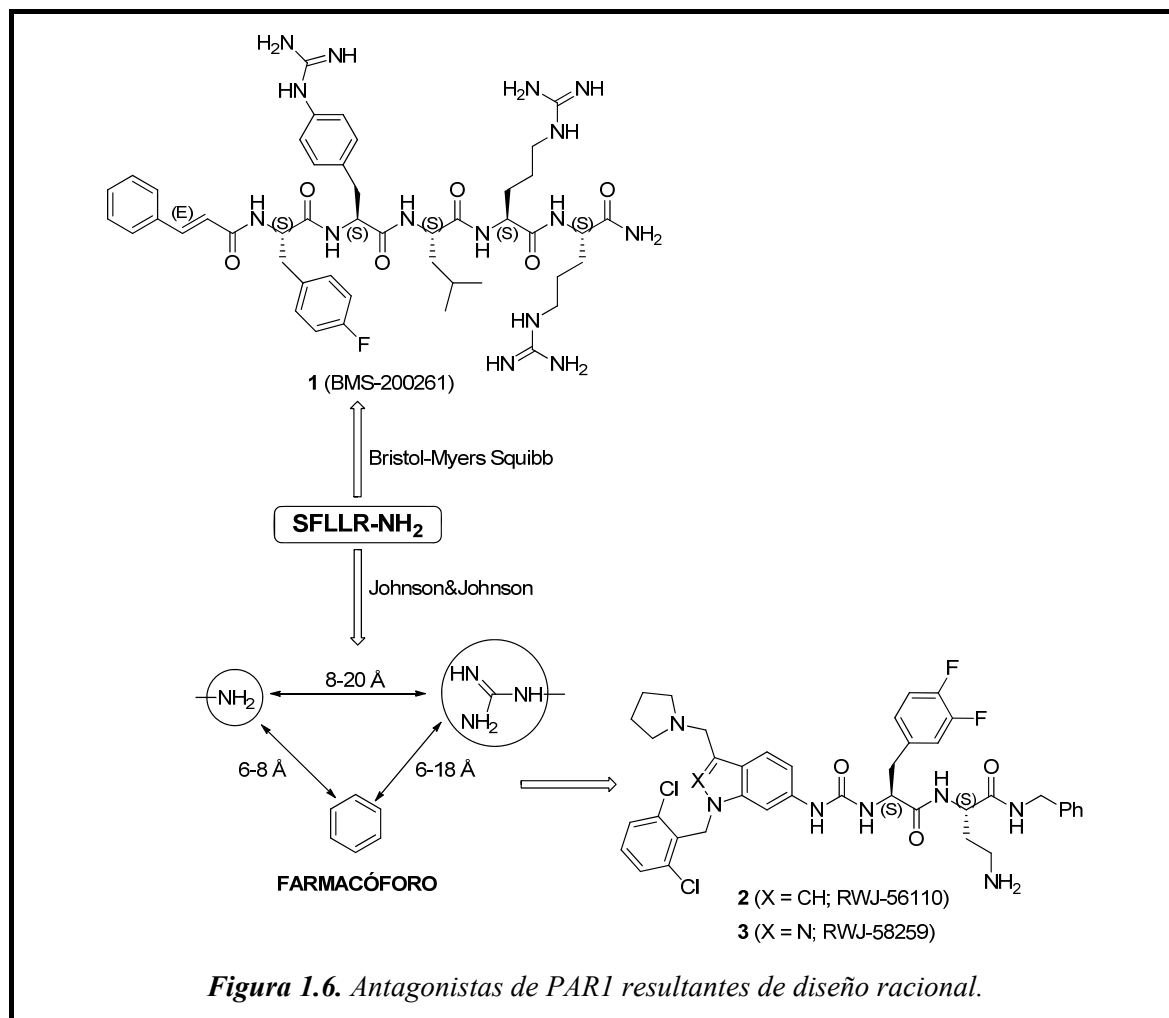
Los múltiples efectos fisiológicos y patofisiológicos regulados por la activación de PAR1 apoyan la hipótesis de que los compuestos capaces de modular las interacciones trombina/PAR1 podrían tener aplicación terapéutica en diversos estados patológicos. Dada la preferente expresión de este receptor en plaquetas y su relación con la cascada de coagulación sanguínea, la búsqueda de antagonistas se ha orientado preferentemente hacia el campo de las enfermedades cardiovasculares, bajo la hipótesis de que podrían ser buenos antitrombóticos, sin los inconvenientes hemorrágicos de los inhibidores de trombina. Por otra parte, teniendo en cuenta la alta asociación entre PAR1 y los procesos cancerosos comentada en el apartado 1.1.3, recientemente, se ha empezado a contemplar la utilización de los antagonistas en cáncer, particularmente, como inhibidores de angiogénesis. En la

actualidad las enfermedades cardiovasculares y los cánceres están consideradas como las dos primeras causas de mortalidad. Además, la disponibilidad de agonistas y antagonistas potentes y específicos de PAR1 tiene interés para uso como herramientas farmacológicas en el estudio de las implicaciones fisiológicas de este receptor. Sin embargo, el descubrimiento de moduladores de PAR1 ha constituido, y constituye, un reto al tener que competir con la activación intramolecular endógena, energéticamente más favorecida. En este reto, el estudio de relaciones estructura-actividad (SAR) de los péptidos activadores (PAR1-APs) fueron el punto de arranque. En este sentido, destacan los primeros estudios con el péptido de 14 aminoácidos que incluye la secuencia 42-55 de PAR1 (SFLLRNPNDKYEPF-NH₂)¹⁸. Estudios posteriores identificaron el hexapéptido SFLLRN-NH₂ como secuencia mínima para la actividad agonista completa y el pentapéptido SFLLR-NH₂ como secuencia mínima con actividad agonista^{135,136}. La modificación extensiva de los PAR1-APs ha delimitado los requisitos estructurales de las interacciones trombina/PAR1, proporcionando la base para el diseño racional de antagonistas. Así, el escaneo con Ala de SFLLRN-NH₂ y modificaciones en su amino N-terminal mostraron la importancia de este amino libre y de Phe, Leu y Arg para la actividad agonista¹³⁵⁻¹⁴¹. Estas y otras modificaciones, incluyendo la incorporación de heterociclos y macrociclos en el péptido han dado lugar a ligandos de PAR1 con actividad agonista, antagonista y mixta agonista-antagonista, aunque, en general, con baja potencia y selectividad^{142,143}. Además, se ha descrito que el péptido TFRRRLSRATR derivado de la secuencia C-terminal del receptor P2Y1 de las plaquetas humanas posee actividad agonista sobre PAR1, siendo TFRRRL la secuencia mínima activa capaz de activar las plaquetas¹⁴⁴. Por otra parte, se ha descrito que el péptido resultante de la hidrólisis de bradiquinina por la enzima convertidora de angiotensina, RPPGF, inhibidor de trombina, inhibe la activación de las plaquetas a concentraciones inferiores a la CI₅₀ de inhibición de la trombina, mediante la unión a PAR1 en su sitio de proteólisis, a través de la R41, impidiendo la activación del receptor por trombina^{145,146}. Es de señalar que, recientemente, se ha descrito que un pentapéptido no natural derivado de la modificación de RPPGF, denominado trombostatina FM19, en administración oral en ratones modelo de cáncer de próstata, a concentraciones inferiores a las requeridas para actividad anticoagulante, disminuyó el número de vasos de los tumores así como el crecimiento tumoral¹⁴⁷.

Desde los años 90, la búsqueda de antagonistas de PAR1 potentes y selectivos ha sido liderada por un pequeño grupo de compañías farmacéuticas, orientada hacia el campo

cardiovascular, particularmente de los antitrombóticos e inhibidores de la aterosclerosis y la reestenosis. En esta búsqueda se han seguido dos estrategias clásicas en Química Médica: (a) diseño racional de peptidomiméticos, basado en los mencionados estudios de relaciones estructura-actividad sobre los PAR1-APs, y (b) cribados de alto rendimiento (HTS) de quimiotecas de moléculas pequeñas.

Aplicando la estrategia (a), a partir de SF(f)F(Gn)LR-NH₂ (f = *p*-fluoro; Gn = *p*-guanidino), uno de los pentapéptidos agonistas más potentes, mediante la sustitución del residuo de serina por un grupo *trans*-cinamoilo o fenilproninoilo, la compañía Bristol-Myers Squibb obtuvo una serie de potentes antagonistas de PAR1. El pentapéptido BMS-200261 (figura 1.6, **1**), el más potente de la serie¹⁴⁸, es antagonista selectivo de PAR1 frente a PAR2²⁴ y PAR4^{149,150}.



Por otra parte, en Johnson&Johnson, teniendo en cuenta información de estudios SAR y de conformaciones de baja energía sobre SFLLRN, definieron un modelo de

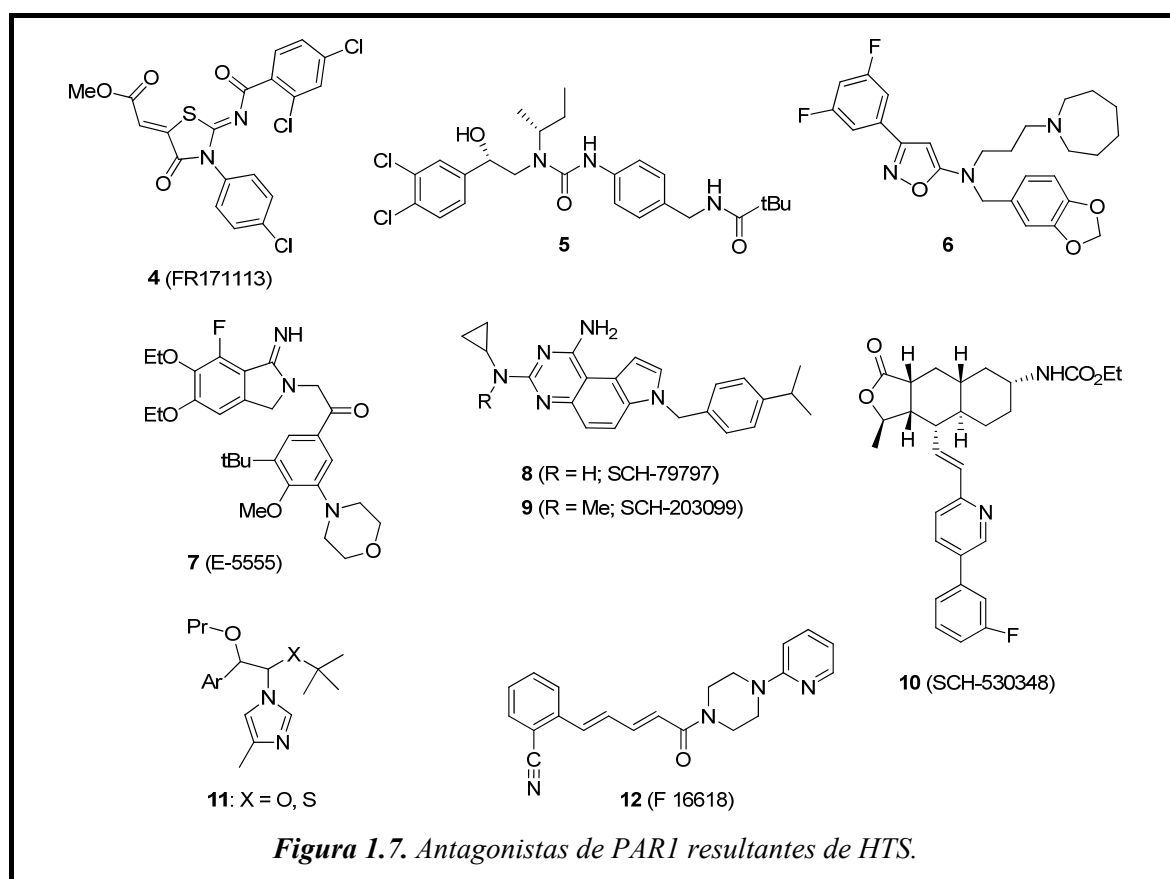
farmacóforo de tres puntos (Figura 1.6), constituido por el grupo amino N-terminal, el anillo de fenilo y el carbono central del grupo guanidino de arginina. Aplicando este modelo de farmacóforo, utilizando esqueletos rígidos como soporte de los grupos farmacofóricos, y optimización estructural obtuvieron varias series de antagonistas^{21,143,151}. Así, el esqueleto de 6-aminoindol, inicialmente seleccionado para orientar adecuadamente los tres grupos farmacofóricos de SFLLRN, y la introducción de un grupo urea como anclaje dieron lugar a la primera serie de antagonistas, que posteriormente fue optimizada, sustituyendo el grupo guanidino por amino con el fin de minimizar efectos cardiovasculares indeseados. Entre estos peptidomiméticos basados en el esqueleto de indol, el compuesto RWJ-56110 (Figura 1.6, **2**) mostró alta potencia antagonista, selectividad por PAR1, y selectividad en la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por trombina o agonistas PAR1 frente a la inducida por colágeno^{152,153}. Además, como se ha comentado en el apartado 1.1.3.4, este antagonista bloqueó la angiogénesis, tanto la básica como la estimulada, en los modelos *in vitro* Matrigel e *in vivo* CAM^{115,116}. Posteriormente, con el fin de optimizar el perfil de seguridad cardiaca de RWJ-56110, particularmente para minimizar el efecto hipotensor, el anillo de indol fue sustituido por su bioisómero indazol para dar lugar a RWJ-58259 (**3**)¹⁵². Este antagonista está considerado como un estándar de referencia en estudios farmacológicos. Es de señalar que, a diferencia de lo que sucede con la mayoría de los antagonistas de PAR1 descritos, RWJ-58259 inhibe de forma similar la agregación plaquetaria inducida por el agonista SFLLRN que por la trombina¹⁵¹. Este antagonista bloqueó la formación de trombos en primates no humanos, constituyendo la primera prueba de la potencial utilidad clínica de los antagonistas de PAR1 en humanos¹⁵⁴, aunque su mala biodisponibilidad oral paralizó su desarrollo clínico¹⁴³. Al igual que RWJ-56110, RWJ-58259 también inhibe la invasión celular en modelos de angiogénesis¹⁴³.

En lo que respecta al HTS de quimiotecas de moléculas pequeñas no peptídicas, esta estrategia ha desvelado varias series de antagonistas representados en la Figura 1.7 por los compuestos más significativos. El derivado de 1,3-tiazolidinona FR171113 (**4**), de Fujisawa Pharmaceuticals, fue el primer antagonista no peptídico de PAR1 descrito. Este antagonista mostró inhibición submicromolar en la agregación de plaquetas humanas inducida por SFLLRN e inhibió la trombosis arterial en cobayas^{155,156}.

Investigadores de Merck han descrito una serie de ureas, representadas por **5**, y otra de derivados de isoxazol, representados por **6**, con afinidad submicromolar por plaquetas e

inhibición de la secreción de serotonina en plaquetas inducida por PAR1-APs^{157,158}. El compuesto más potente de estas series **6** inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina 1 nM, a concentración 1 μ M.

La compañía japonesa Eisai Inc. ha patentado un gran número de 2-iminoimidazoles, 2-iminopirrolidinas y guanidinas y amidinas cíclicas como antagonistas de los receptores de trombina¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Entre estos compuestos, las amidinas bicíclicas fueron las que mostraron mejores resultados, destacando E-5555 (**7**), activa por vía oral, que inhibe la agregación plaquetaria inducida por trombina a concentración 64 nM. Este compuesto se encuentra en la actualidad en experimentación clínica fase II en Japón, en pacientes con síndrome coronario agudo y en enfermos con daños en las arterias coronarias¹⁶², aunque la información sobre los resultados de las fases preclínicas es muy escasa¹⁴³.



Hay que señalar las aportaciones de la compañía Schering-Plough en la búsqueda de antagonistas de PAR1 mediante HTS. Primero, describieron la pirroloquinazolina SCH-79797 (**8**) y su *N*-metil-derivado SCH-203099 (**9**), antagonistas potentes y selectivos de

PAR1 en plaquetas humanas y en células de músculo liso cuando se utilizan PAR1-APs como agonistas, aunque con relativa baja potencia antagonista en la agregación plaquetaria inducida por trombina (3 y 0.7 μ M, respectivamente)^{163,164}. Es de señalar que SCH-79797 es un potente agente antiangiogénico en modelos *in vivo*^{115,116}, bloquea la migración celular, reduce el daño producido en el miocardio por isquemia/reperfusión y muestra efectos antiproliferativos en diversas líneas de células tumorales¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Aunque, parece ser que los efectos antiproliferativos no están mediados a través de PAR1¹⁶⁸. El éxito principal de Schering-Plough en este campo lo constituyó el descubrimiento en 2005 de una familia de antagonistas de PAR1 derivados de producto natural himbacina¹⁶⁹, descubiertos dentro de una campaña de búsqueda de ligandos para los receptores muscarínicos. Extensivos estudios SAR condujeron a SCH-530348 (Figura 1.7, **10**), recientemente denominado “Vorapaxar”, potente antagonista competitivo de PAR1 (K_i = 8.1 nM), inhibe la agregación de plaquetas humanas inducida por trombina a concentración 47 nM y con excelente biodisponibilidad oral¹⁷⁰. Los buenos resultados de la investigación preclínica de vorapaxar facilitaron su paso a experimentación clínica, pasando en 2007 a fase III en síndrome coronario agudo y en prevención secundaria de daños cardiovasculares y trombosis en pacientes de alto riesgo¹⁷¹.

Por último, recientemente, los laboratorios Pierre Fabre han descrito dos series de antagonistas estructuralmente no relacionadas derivadas de HTS, seguido de optimización, entre los que se encuentran los éteres y tioéteres derivados de imidazol **11**¹⁷² y amidas de piperazinas representadas por **12** (F 16618)^{173,174}. Este antagonista, el más avanzado de estas series, ha mostrado potente actividad antitrombótica y reducción de restenosis en la arteria carótida de ratas, sin afectar al tiempo de coagulación^{175,176}.

De la comparación estructural entre las distintas familias de antagonistas no peptídicos descubiertos por HTS y con los peptidomiméticos resultantes del diseño racional no se deducen hechos estructurales comunes más allá de la presencia de grupos aromáticos y básicos, que, como se ha comentado, se incluían en el modelo de farmacóforo.

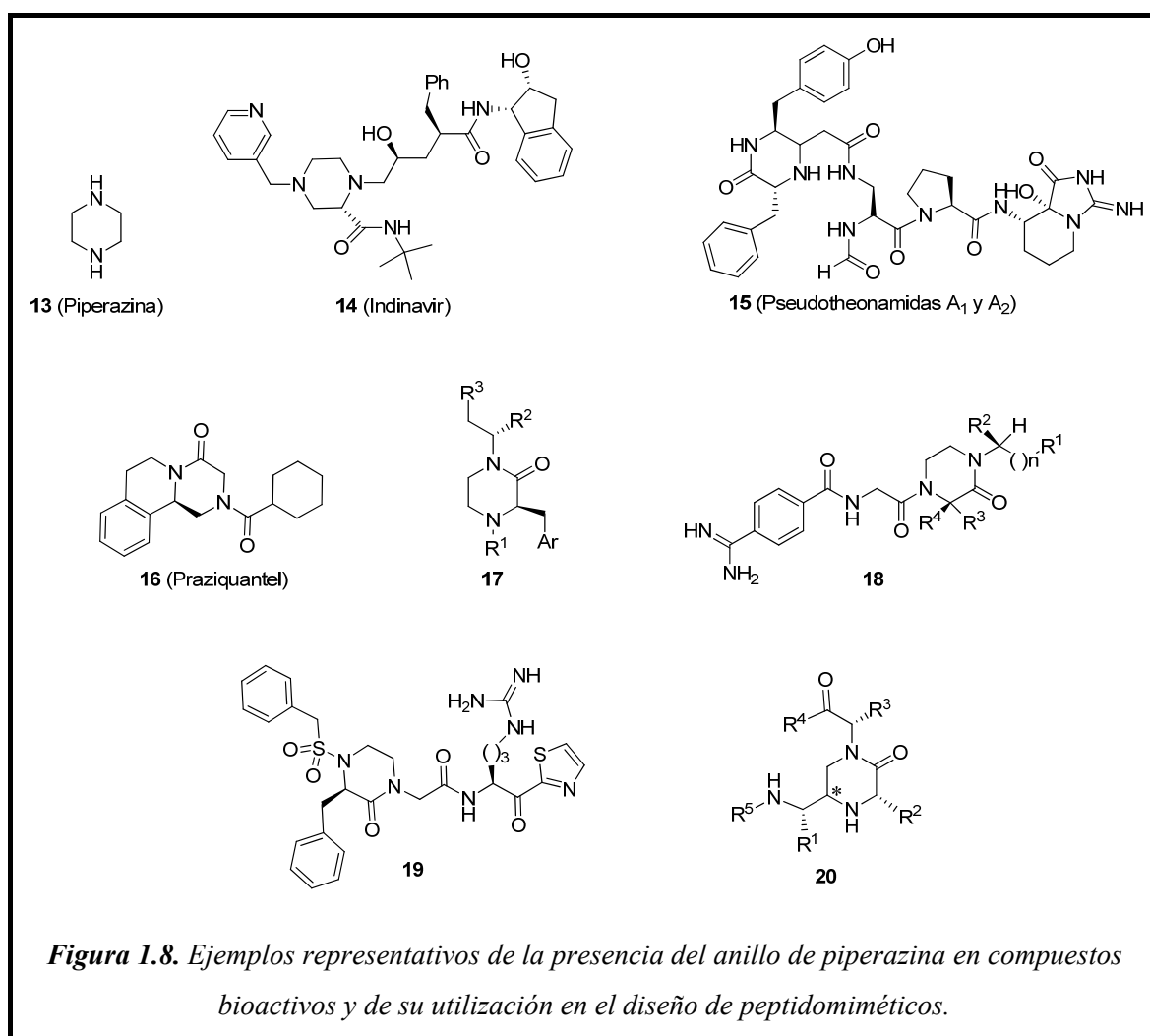
Como una estrategia diferente en la búsqueda de antagonistas de PAR1, hay que señalar los recientes resultados prometedores de antagonistas basados en pepducinas en la prevención de trombos en modelos animales de cáncer de mama³¹. Estos antagonistas son péptidos lipidados derivados de secuencias de los bucles intracelulares de PAR1, capaces de penetrar en la célula, e interferir con la unión PAR1/proteínas G, bloqueando la

transmisión de señales^{177,178}. El diseño de pepducinas parte de los estudios de mutagénesis que indican que el 3^{er} bucle intracelular (i3) de los GPCR media en gran medida el acoplamiento del receptor con sus correspondientes proteínas G¹⁷⁹. En el caso de PAR1, se ha visto que la secuencia del i3 denominada P1-i3-40, que contiene aminoácidos próximos a la parte intracelular de la hélice α transmembrana 5 (TM5), induce una rápida entrada de calcio en las plaquetas, indicativa de activación^{177,178}. A partir de este resultado, mediante sucesivos truncados y *N*-palmitoilaciones, para favorecer la penetración en la célula, se obtuvo la pepducina denominada P1pal-12 (palmitoilo-NH-RCLSSSAVANRS-NH₂), antagonista completo de PAR1, capaz de bloquear la entrada de calcio inducida por trombina en plaquetas, así como su agregación inducida por SFLLN-NH₂^{177,178}. P1pal-12, así como el análogo heptapeptídico P1pal-7 inhibieron también el crecimiento tumoral y la angiogénesis en xenoinjertos de cáncer de mama en ratones desnudos³¹.

A pesar del avance significativo que constituyen los antagonistas de PAR1 descritos en los últimos 10 años, su número es todavía muy limitado, así como la información disponible sobre ellos. Particularmente, en lo que se refiere a su sitio de unión al receptor y a la actividad *in vivo* en modelos animales apropiados, en los que tienen que competir con el principal agonista endógeno, la trombina, y no con los AP1-APs utilizados en la mayoría de las evaluaciones biológicas. Como ya se ha comentado en el punto 1.1.4, no existe información estructural sobre el sitio de unión de ninguno de los antagonista descritos hasta ahora, información que permitiría un diseño racional basado en la estructura del receptor. Por otra parte, la dificultad de disponer de preparaciones rápidas y estables del receptor y de ligandos radioactivos apropiados, para ensayos masivos de unión de ligandos a PAR1, ha dificultado el desarrollo de proyectos de búsqueda de antagonistas¹⁵¹. Estos ensayos se realizan en preparaciones de membranas de plaquetas humanas¹⁸⁰ o de células CHRF-288-11¹⁸¹, que no son comerciales. De hecho, actualmente, la mayoría de las evaluaciones de potenciales ligandos de PAR1 todavía se realizan determinando la inhibición de la agregación de plaquetas en sueros humanos, con la dificultad que supone la manipulación de muestras de origen humano. A estas dificultades hay que añadir la especificidad de especie animal, comentada en el apartado 1.1.2, que imposibilita el uso de las especies animales más habituales en experimentación animal para los modelos *in vivo*.

1.1.6. El anillo de 2-oxopiperazina: un esqueleto privilegiado en Química Médica

La recurrente presencia del anillo de piperazina en compuestos biológicamente activos ha motivado su inclusión entre los llamados “esqueletos privilegiados” en Química Médica^{182,183}. En la actualidad hay 112 entradas para fármacos derivados de piperazina en el Drug Bank (<http://www.drugbank.ca>)¹⁸⁴. El primer fármaco fue la propia piperazina (Figura 1.8, **13**), introducido en 1953 como antihelmíntico y muy utilizado para el tratamiento de la obstrucción intestinal¹⁸⁵. Posteriormente, se han introducido otros muchos en diversos campos de actividad farmacológica, como por ejemplo el inhibidor de la proteasa del VIH indinavir (**14**)¹⁸⁶.



Entre los derivados de piperazina, el esqueleto de 2-oxopiperazina se encuentra presente en diversos productos naturales, como por ejemplo, entre otros, en las

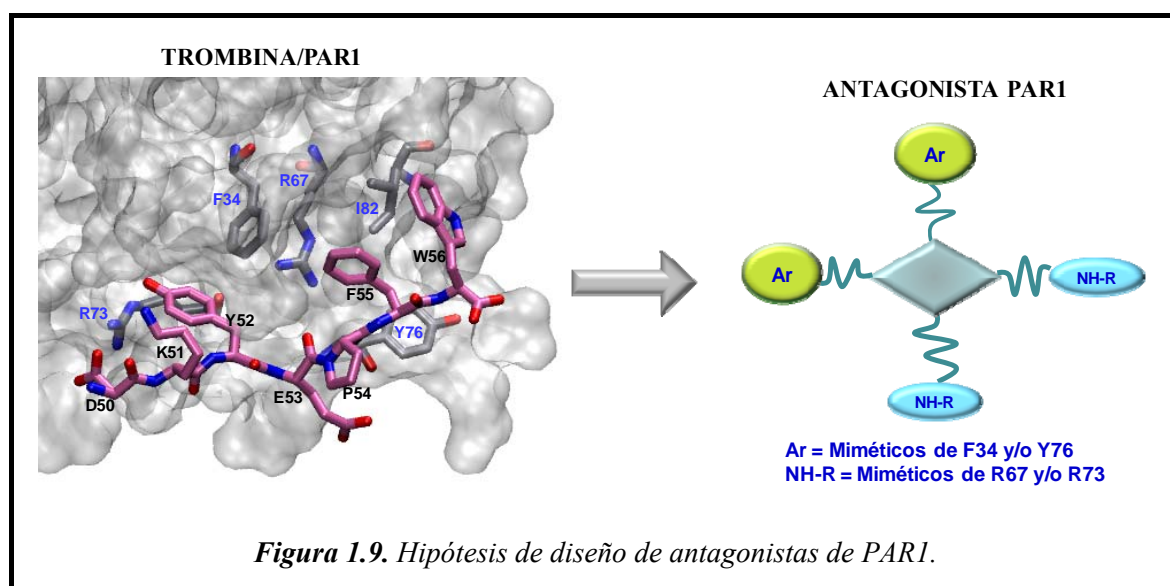
pseudotheonamidas (**15**), inhibidores de serina proteasas¹⁸⁷. Un ejemplo representativo de la presencia del anillo de 2-oxopiperazina en fármacos lo constituye el antihelmíntico praziquantel¹⁸⁸ (**16**), en el que se encuentra fusionado con un anillo de tetrahidroisoquinolina. Además, el anillo de 2-oxopiperazina también ha sido utilizado para la introducción de restricción conformacional en péptidos y en el diseño de peptidomiméticos. Así, por ejemplo, este anillo forma parte de la estructura de antagonistas de neuroquininas¹⁸⁹ y colecistoquinina^{189,190} de fórmula general **17**, agonistas del receptor de melanocortina-4¹⁹¹, antagonistas del neuropéptido S¹⁹², y antagonistas del fibrinógeno (**18**)^{193,194}. También se ha utilizado en el diseño de inhibidores de diversas peptidasas¹⁹⁵, tales como: el factor Xa (**19**)¹⁹⁶, elastasa¹⁹⁷, renina^{198,199}, geranilgeraniltransferasa-I²⁰⁰ y β -secretasa 1 (BACE1)²⁰¹. En el campo de los miméticos de estructura secundaria peptídica, las 2-oxopiperazinas quirales de fórmula general **20** fueron diseñadas por nuestro grupo de investigación como miméticos de giros inversos γ ²⁰².

1.2. HIPÓTESIS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ANTAGONISTAS DE PAR1

A pesar de la alta asociación del receptor de trombina PAR1 con el desarrollo, crecimiento e invasión tumoral, hasta ahora no se ha contemplado el estudio de la utilización de los antagonistas de este receptor como una posible terapia en el tratamiento del cáncer. Solo muy recientemente, se ha empezado a explorar la utilización de un reducido número de antagonistas como herramientas farmacológicas en este campo, preferentemente como inhibidores de la angiogénesis^{115,116}. Por ello, como una alternativa novedosa, aunque arriesgada, en la búsqueda de agentes antitumorales, en el año 2007 el grupo de Peptidomiméticos del Instituto de Química Médica del CSIC inició un proyecto de investigación orientado al diseño y síntesis de nuevos antagonistas de PAR1 como aproximación innovadora a la búsqueda de nuevos inhibidores de la angiogénesis. Inicialmente, este proyecto se enmarcó dentro del proyecto SAF-2006-01205, *“Peptidomiméticos como herramientas para el desarrollo de moduladores de interacciones proteína-proteína”* y desde enero del 2010 se encuadra en el proyecto SAF2009-09323 *“Diseño racional y diversidad molecular: dos estrategias convergentes para la modulación de interacciones proteína-proteína terapéuticamente relevantes”*.

Como se ha comentado, las conclusiones de los estudios estructurales para la interacción trombina/PAR1, indican que la primera interacción entre la trombina y su receptor PAR1 se produce a nivel de la secuencia similar a hirudina (D⁵⁰KYEPF⁵⁵), en el exosítio I de trombina, y que esta interacción es esencial y determinante para la proteólisis y activación del receptor. Teniendo en cuenta estas conclusiones, como hipótesis para la obtención de nuevos antagonistas de PAR1 se planteó el diseño de peptidomiméticos del exosítio I de trombina, capaces de bloquear esa primera interacción de la trombina con la

secuencia similar a hirudina de PAR1. Dado que, como se ha mostrado en la Figura 1.5, los residuos de trombina críticos para la interacción inicial con PAR1 (Phe³⁴, Arg⁶⁷, Arg⁷³, Tyr⁷⁶, e Ile⁸², en inglés denominados “hot spots”) son discontinuos y no se encuentran localizados formando una estructura peptídica secundaria definida, es difícil plantear un diseño basado en miméticos de estructura secundaria. Por ello, aplicando una estrategia de síntesis orientada a la diversidad (DOS) para explorar el espacio de interacción proteína-proteína, tal como se muestra de forma simplificada en la Figura 1.9, se planteó un diseño basado en estructuras de flexibilidad variable, portadoras de, al menos, tres puntos de diversidad para el anclaje de agrupamientos que pudieran mimetizar los mencionados “hot spots” del exosito I de trombina en su interacción con PAR1. Es decir: uno o dos grupos hidrófobos capaces de mimetizar el bolsillo hidrófobo definido por F34, Y76 y I82, y uno o dos grupos básicos capaces de mimetizar R67 y/o R73.



Con la diversidad de esqueletos de anclaje se pretendía modular la topografía y la flexibilidad global de la molécula, mientras que, con la diversidad de anclajes y decoraciones se pretendía modular la distancia entre los grupos farmacofóricos, su flexibilidad y su funcionalidad. Además, este diseño podría ajustarse también al mencionado modelo de farmacóforo triangular.

1.3. OBJETIVOS

Como objetivo general de la tesis doctoral que se recoge en esta Memoria, se planteó el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos peptidomiméticos capaces de inhibir la activación de PAR1 por trombina, mediante el bloqueo de la primera interacción entre ambas proteínas en el exosito I de trombina, que es determinante y esencial para dicha activación. Este objetivo general se puede desglosar en tres objetivos más concretos:

- a) De acuerdo con la hipótesis de diseño, mediante una estrategia de diseño orientado a la diversidad estructural, seleccionar estructuras versátiles, de flexibilidad variable, portadoras de, al menos, tres puntos de diversidad para el anclaje de grupos capaces de mimetizar las cadenas laterales de los aminoácidos del exosito I de trombina importantes para su interacción con PAR1 a nivel de la secuencia similar a hirudina.
- b) Aplicando una estrategia de síntesis orientada a la diversidad, sintetizar pequeñas quimiotecas de las estructuras seleccionadas, que permitiesen explorar el espacio químico, en lo que respecta a distancias y flexibilidad, utilizando, a ser posible, herramientas de síntesis generadoras de diversidad desarrolladas en el grupo de investigación.
- c) Evaluación de las nuevas moléculas sintetizadas, en primer lugar, como potenciales antagonistas de PAR1 y, posteriormente, aquellas que en esta primera evaluación mostrasen actividad significativa, como inhibidores de angiogénesis. La consecución de este objetivo requería la utilización de un antagonista PAR1 de referencia. Teniendo en cuenta que cuando se inició el proyecto ninguno de los antagonistas conocidos era comercial, ni tampoco fueron accesibles a través de las empresas que los habían desarrollado, dentro de este objetivo se contempló la síntesis de uno de los antagonistas

utilizados como referencia en estudios biológicos previos. Entre estos antagonistas, se consideró la síntesis de RWJ-58259 o de SCH-530348. A la vista de las respectivas metodologías sintéticas descritas para ambos, se decidió la preparación de RWJ-58259.

1.4. PLAN DE TRABAJO

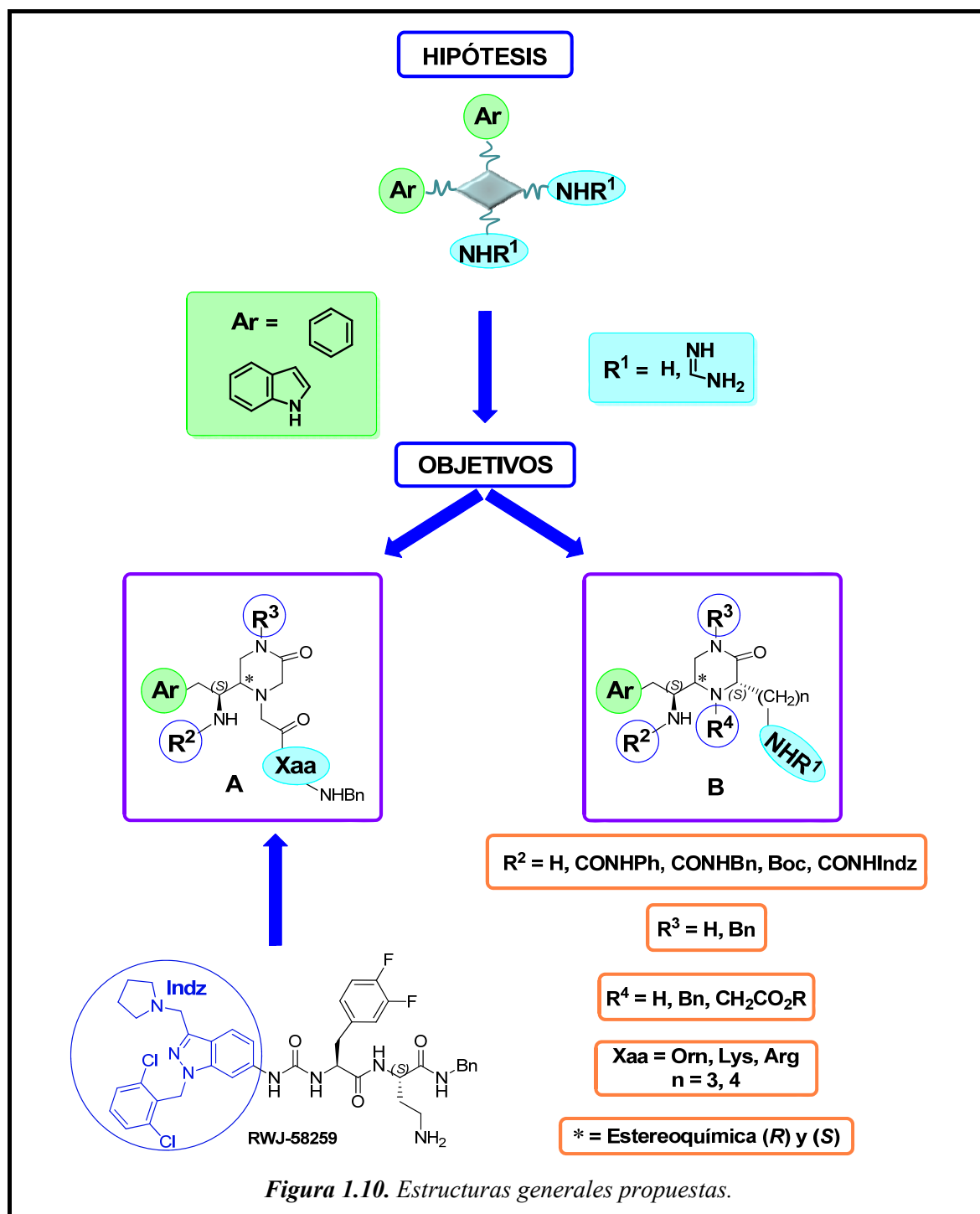
1.4.1. Optimización de la síntesis del antagonista de referencia RWJ-58259

La síntesis del antagonista de referencia RWJ-58259, inicialmente, se abordó aplicando la metodología descrita^{152,203}. Sin embargo, el rendimiento obtenido fue tan bajo que fue necesario llevar a cabo un estudio completo de puesta a punto del procedimiento para la obtención de la cantidad requerida.

1.4.2. Diseño de estructuras

De acuerdo con la hipótesis de diseño, se plantearon varias pequeñas quimiotecas, entre las cuales se seleccionaron las dos series de derivados de 2-oxopiperazina de estructuras generales **A** y **B** (Figura 1.10), capaces de aportar, al menos, tres puntos de diversidad, a los que unir los denominados grupos farmacofóricos (uno o dos grupos aromáticos y uno o dos grupos de carácter básico) a distancias y con topografías diversas. La síntesis de estas quimiotecas se propuso partir de precursores comunes, ya que éste es uno de los principios de peso en la síntesis orientada a la diversidad (DOS)²⁰⁴⁻²⁰⁹.

El grupo **Ar** de las estructuras **A** y **B** identifica grupos aromáticos de aminoácidos naturales, preferentemente fenilo e indol (Phe y Trp), aunque, dependiendo de los resultados biológicos iniciales, se plantearía la introducción de fenilos sustituidos, como el de la difluorofenilalanina presente en el antagonista RWJ-58259.



Como grupos básicos se plantearon el amino de la cadena lateral de lisina o de ornitina y el guanidino de arginina (NH-R^1).

Como grupo R^2 , se plantearon tanto H como grupos aromáticos, o simultáneamente aromáticos y básicos, como es el caso de la introducción del agrupamiento indazólico de RWJ-58259, unidos a través de un grupo urea. Hay que señalar que la importancia del

grupo ureido viene reforzada, además de por su presencia en RWJ-58259, por su presencia en la serie de ureas antagonistas de PAR1 **5**, desarrollados por Merck mediante HTS.

En **R**³ de las estructuras generales **A** y en **R**³ y **R**⁴ de **B** se podrían introducir grupos adicionales aromáticos o de carácter básico.

En el centro quiral (*), que se generaría en el proceso de síntesis, se plantearon las dos estereoquímicas (*R*) y (*S*). Sin embargo, en el resto de centros quirales, que procederían de los compuestos de partida para la síntesis, en principio, solo se plantearon con configuración (*S*), susceptible de modificación en caso de ser necesario para estudios SAR.

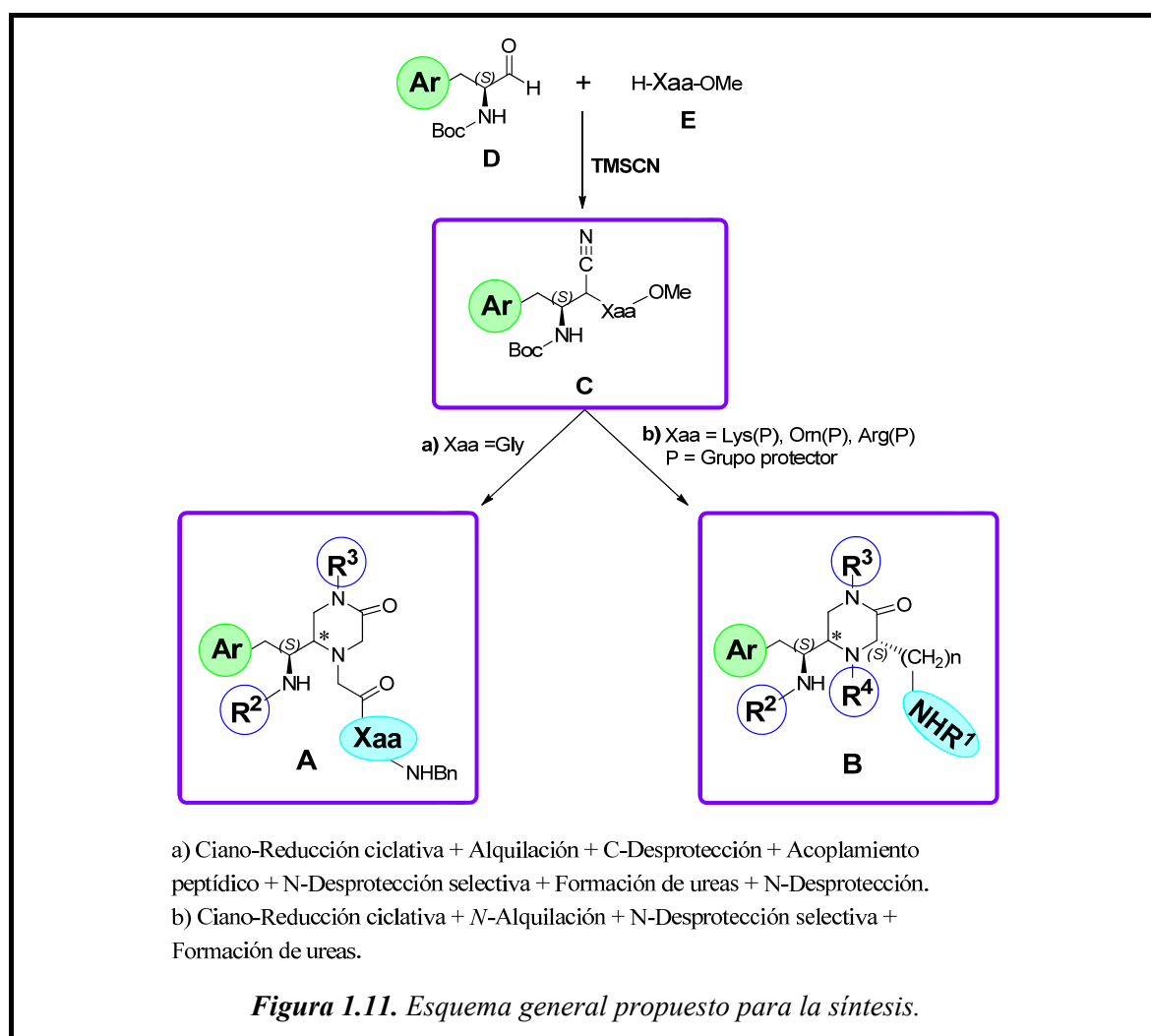
El diseño de las estructuras **A** y **B** se planteó para ejecutarlo de forma interactiva, flexible y coordinada con los resultados que se fuesen obteniendo de la evaluación biológica de los compuestos sintetizados.

1.4.3. Síntesis

Para la síntesis de las estructuras propuestas **A** y **B** se proyectó un esquema de síntesis basado en la experiencia previa del grupo en el campo de los peptidomiméticos, teniendo en cuenta dos de los principios de la síntesis orientada a la diversidad²⁰⁴, como son: a) Aprovechamiento de la eficiencia de las reacciones multicomponente; y b) La presencia de grupos reactivos en los productos de reacción permite aplicar esquemas de síntesis con puntos de ramificación, donde un intermedio común es usado en diferentes reacciones para dar lugar a esqueletos diversos, multiplicando la diversidad. Por ello, se planteó un esquema de síntesis versátil y ramificado, aprovechando el alto potencial de los α -aminonitrilos derivados de aminoácidos para la generación de diversidad molecular, puesto de manifiesto previamente por nuestro grupo de investigación²¹⁰ (Figura 1.11).

En la síntesis de los dos tipos de estructuras planteadas **A** y **B** se utilizarían, como intermedios comunes, los α -aminonitrilos derivados de aminoácidos de fórmula general **C**. Estos α -aminonitrilos se obtendrían mediante una reacción de tres componentes de Strecker, consistente en la adición *in situ* de cianuro de trimetilsililo (TMSCN) a la imina intermedia formada entre los α -aminoaldehídos **D**, portadores de grupos aromáticos, y glicina (para **A**) o aminoácidos básicos *N*(α)-desprotegidos **E**. La adecuada manipulación química de la reactividad del grupo ciano, junto con la de los grupos reactivos del

aminoácido, mediante reacciones sencillas de reducción, reacciones con isocianatos, ciclación, alquilaciones y eliminación de grupos protectores permitiría acceder a las estructuras propuestas **A** y **B**. El esquema de síntesis propuesto tiene la ventaja de que tanto los derivados de los aminoácidos como la mayoría de los otros reactivos necesarios son de fácil acceso comercial. Dado que en la síntesis de los α -aminonitrilos **C** se genera un nuevo centro estereogénico, habría que prestar especial atención a la estereoselectividad de los procesos o a la resolución de epímeros. Como se ha comentado en el apartado anterior, en principio, solo se utilizarían aminoácidos de la serie natural L, mientras que, los de la serie D solo serían considerados en el caso de que fuesen necesarios para estudios SAR.



1.4.4. Evaluación biológica

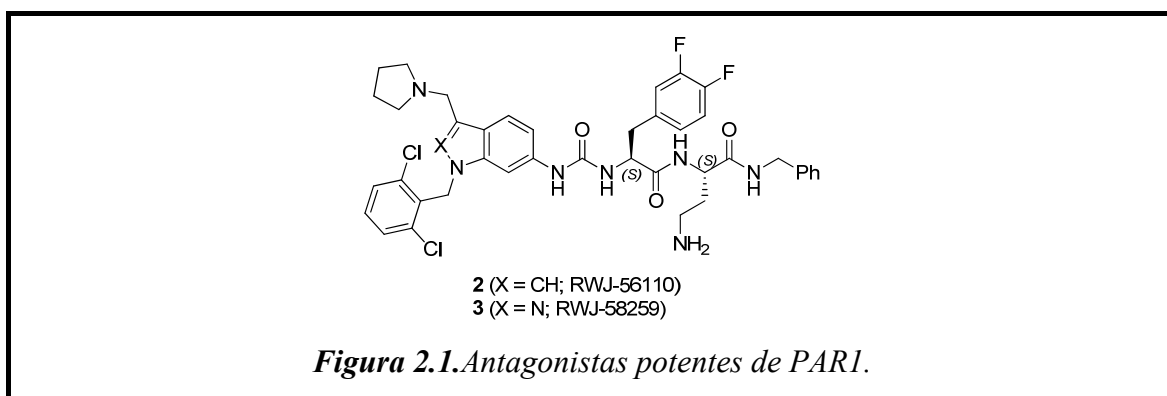
Los compuestos de las series **A** y **B**, así como todos los intermedios de la síntesis, serían evaluados como antagonistas de los receptores PAR1 e inhibidores de angiogénesis en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Patras en Grecia, bajo la dirección del Dr. Nikos E. Tsopanoglou, con quien se está colaborando para la realización de este proyecto. Este grupo ha estudiado el papel de la trombina en la angiogénesis y la progresión tumoral^{109,110,112,211} y, recientemente, ha demostrado el bloqueo de la angiogénesis por antagonistas de PAR1^{115,116}. En primer lugar, los compuestos serían cribados en ensayos de agregación plaquetaria, ya que, como se ha comentado, el PAR1 humano se expresa principalmente en estas células, en las que su activación por trombina induce agregación. Los compuestos que inhibiesen la agregación plaquetaria serían evaluados en células endoteliales en ensayos de movilización de calcio, dado que en estas células la activación de PAR1 induce movilización de calcio. Por último, los compuestos que pasasen estos filtros iniciales de actividad serían evaluados en el modelo *in vivo* de angiogénesis de la membrana corioalantoidea de pollo.

Además, todos los compuestos sintetizados serían evaluados como potenciales agentes citotóxicos por la compañía PharmaMar, S. A., EPO de los proyectos mencionados, en los que se ha encuadrado esta tesis doctoral.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL ANTAGONISTA PAR1 DE REFERENCIA RWJ-58259

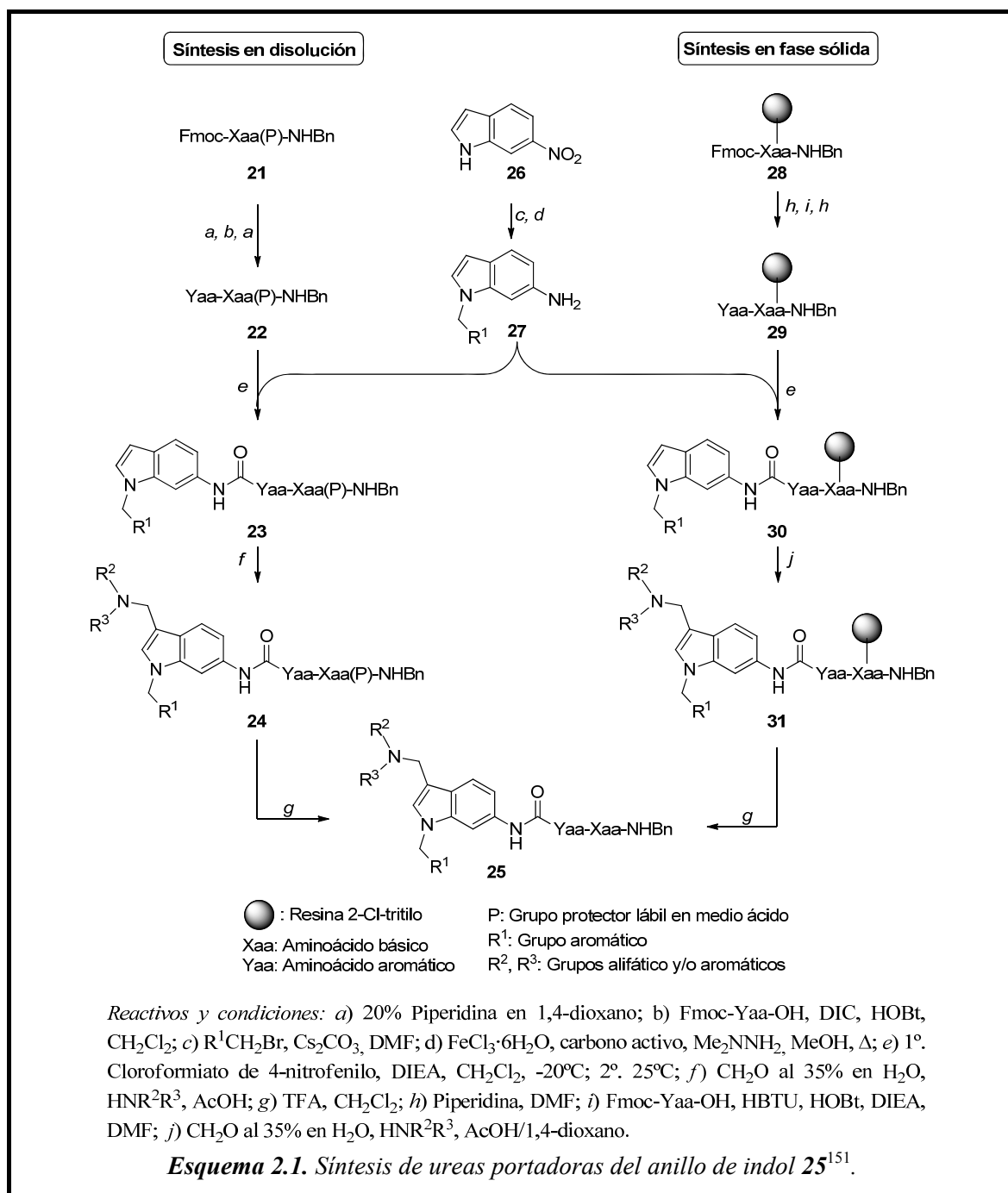
Tal como se ha comentado en la Introducción (Apartado 1.1.5), RWJ-58259 (Figura 2.1, **3**), antagonista de los receptores PAR1 utilizado como referencia en estudios biológicos, surgió de los esfuerzos de investigadores de Johnson&Johnson para minimizar la toxicidad cardiaca del antagonista análogo **2**, portador de un anillo de indol en lugar de indazol. Este antagonista fue el resultado del proceso de optimización de la serie de ureas de fórmula general **25** (Esquema 2.1).



Para la síntesis de las ureas **25**, los investigadores de Johnson&Johnson desarrollaron dos métodos alternativos¹⁵¹, que, tal como se muestra en el Esquema 2.1, en ambos casos, conllevan cuatro etapas clave: a) preparación, por separado, de cada uno de los fragmentos integrantes de la urea; b) acoplamiento de estos fragmentos en la formación de la urea; c) incorporación del sustituyente en la posición 3 del indol, mediante una reacción de Mannich de tres componentes y d) eliminación de grupos protectores de la

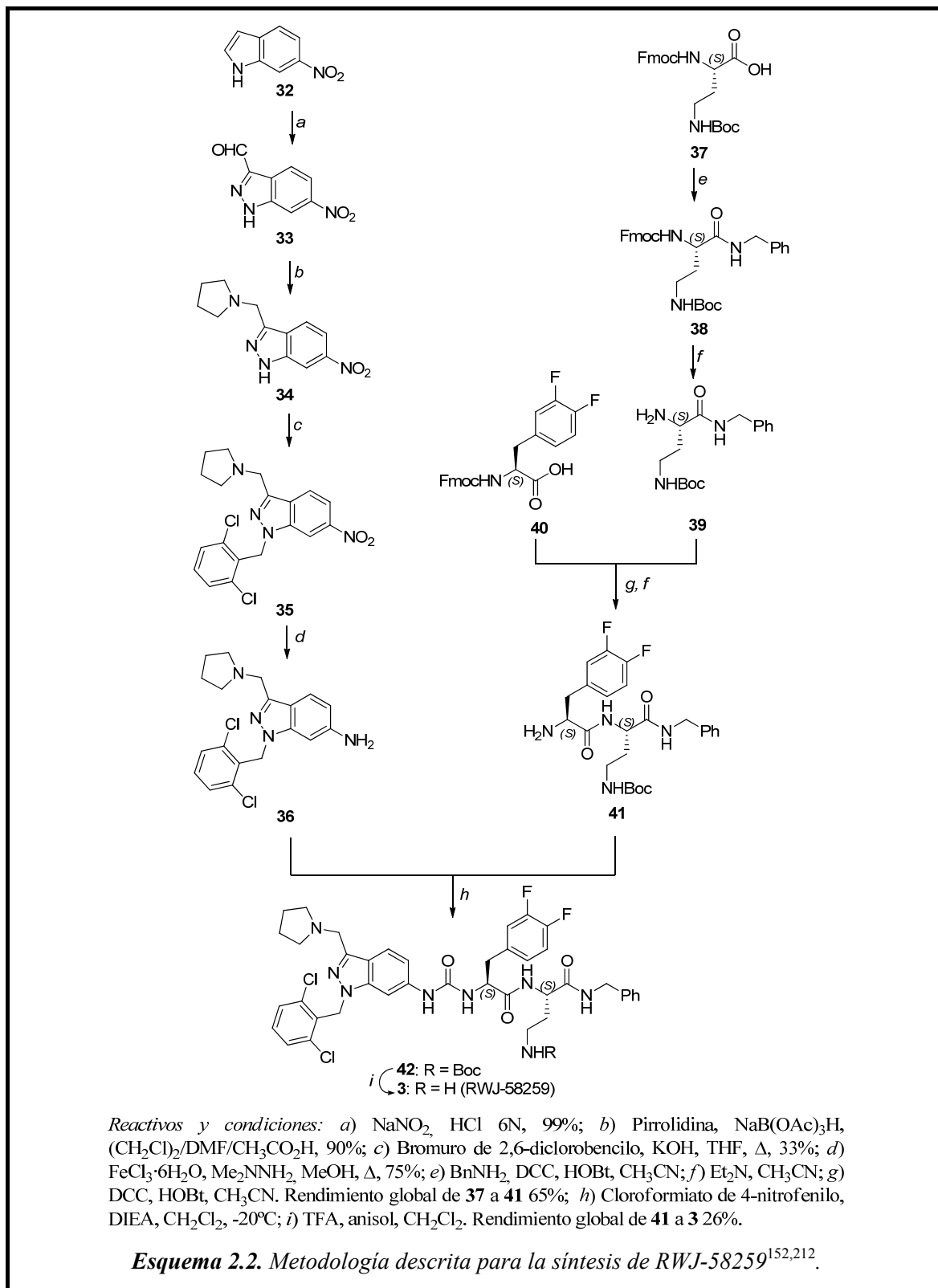
cadena lateral del aminoácido. Inicialmente, esta síntesis se puso a punto en disolución e implica, en primer lugar, la síntesis del dipéptido **22**, seguida de reacción con el correspondiente isocianato derivado del 6-aminoindol **27**, preparado *in situ* por reacción con cloroformiato de 4-nitrofenilo, para dar lugar a las ureas **23**. A continuación, se introduce el agrupamiento aminometil disustituido en la posición 3 del indol, mediante reacción con una amina disustituida en presencia de formaldehído. Finalmente, la eliminación de los grupos protectores del aminoácido básico de **24** conduce a las ureas objetivo **25**. Posteriormente, con el fin de facilitar la preparación de análogos, este método fue optimizado para su aplicación en fase sólida¹⁵¹. En esta metodología, se utiliza una resina 2-Cl-tritilo sobre la que se ancla la bencilamida del aminoácido básico a través de su cadena lateral para dar lugar a **28**. Sobre este compuesto se va elongando el resto de la molécula, utilizando HBTU/HOBt/ en DMF, en lugar de DIC/HOBt en CH₂Cl₂, como agentes de acoplamiento. Al igual que en la metodología en disolución, la síntesis del fragmento derivado de indol **27** se realiza por separado en disolución. La reacción de Mannich de tres componentes se lleva a cabo en mezcla AcOH/1,4-dioxano (1:4), en lugar de en AcOH. Por último, se lleva a cabo el desanclaje de la resina por tratamiento con TFA en CH₂Cl₂ para dar lugar a las ureas objetivo **25**. La aplicación de este método en fase sólida, además de facilitar la preparación de 1200 ureas portadoras del anillo de indol como soporte de los grupos farmacofóricos, evita las etapas de purificación, permitiendo aumentar significativamente el rendimiento de las ureas **25** del 40 al 70%.

Para la síntesis de RWJ-58259 los investigadores de Johnson&Johnson, inicialmente, intentaron aplicar la metodología puesta a punto para la síntesis de los derivados indólicos **25**. Sin embargo, su aplicación no fue posible debido a la imposibilidad de aplicación de la reacción de Mannich de tres componentes para la introducción del grupo pirrolidínmetilo en la posición 3 del anillo de indazol. Por ello, desarrollaron un nuevo protocolo de síntesis en disolución^{151,152,212}, que, tal como se muestra en el Esquema 2.2, conlleva la formación de la urea protegida **42** mediante la síntesis en paralelo de los dos fragmentos que la integran, el fragmento derivado del 6-aminoindazol **36** y el dipéptido **41**. La diferencia más significativa entre esta metodología y la optimizada para la síntesis de las ureas derivadas del anillo de indol, estribaba en que la introducción del grupo pirrolidinmetilo se realiza mediante aminación reductora del 3-formil-6-nitroindazol **33** por reacción con pirrolidina, previamente a la *N*-alquilación de la posición 1.



La síntesis del fragmento derivado de indazol **36** se describe a partir del producto comercial 6-nitroindol (**32**), el cual a través de reacción con NaNO₂ en medio ácido, que conlleva nitrosación del nitrógeno indólico, seguida de apertura y cierre del anillo con trasposición del grupo nitro, da lugar al 3-formil-6-nitroindazol **33**. Seguidamente, la aminación reductora de **33** con pirrolidina, utilizando triacetoxiborohidruro sódico como agente reductor, conduce a 6-nitro-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1*H*-indazol (**34**). La *N*-alquilación en la posición 1 del anillo de indazol de **34**, utilizando bromuro de 2,6-

diclorobencilo como agente alquilante y KOH como base, conduce al correspondiente diclorobencil derivado **35** con rendimiento del 33%. Finalmente, a través de la reducción



del grupo nitro del compuesto **35**, mediante transferencia de hidrógeno, utilizando dimetilhidrazina como generador de hidrógeno y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como catalizador, se obtiene la correspondiente amina **36** con un 75% de rendimiento.

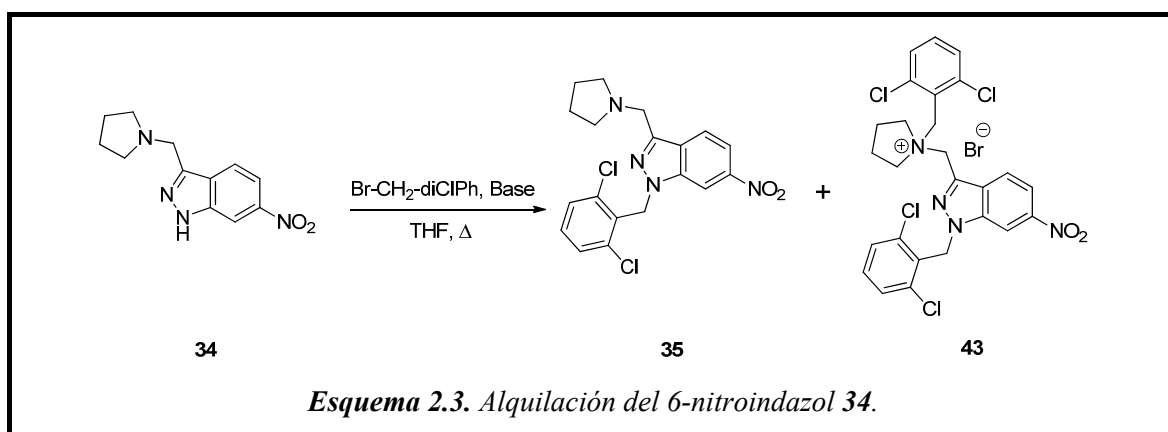
Por otra parte, la síntesis del fragmento dipeptídico **41** se describe mediante acoplamiento de la bencilamida **38**, derivada del ácido N_α -Fmoc- N_γ -Boc-diaminobutírico [Fmoc-Dab(Boc)-OH, **37**], y Fmoc-3,4-difluorofenilalanina (Fmoc-3,4-F-Phe, **40**), utilizando HOBt y DIC como agentes de acoplamiento, seguido de eliminación del grupo protector Fmoc, por tratamiento con dietilamina. Por último, se lleva a cabo la formación de la urea asimétrica entre los fragmentos **36** y **41**, por tratamiento con cloroformiato de 4-nitrofenilo en presencia de DIEA, y se elimina el grupo protector Boc de la cadena lateral del residuo de diaminobutírico, mediante tratamiento con TFA/anisol. El rendimiento global descrito para RWJ-58259, a partir de 6-nitroindol (**32**), es del 5.8%.

Cuando se intentó reproducir la metodología descrita en nuestro laboratorio, la formación de la urea **42** se obtuvo con muy bajo rendimiento, un 10% frente al 26% descrito. El bajo rendimiento global de la síntesis hacía muy costosa la obtención de la cantidad requerida para los ensayos biológicos (≈ 100 mg), dado que tanto los aminoácidos no proteinogénicos Fmoc-Dab(Boc)-OH(**37**) y Fmoc-3,4-F-Phe (**40**) como el 6-nitroindol (**32**), son compuestos de partida de elevado precio comercial. A la vista de este resultado y con el fin de optimizar el método de síntesis de RWJ-58259, se decidió hacer un estudio de las etapas donde se habían obtenido menores rendimientos: a) *N*-alquilación en la posición 1 del indazol **34**; b) reducción del grupo nitro del indazol **35** y c) formación de la urea entre los fragmentos indazólico **36** y dipeptídico **41**.

2.1.1. Estudio de optimización de la *N*-alquilación en posición 1 del indazol. Preparación del 1-(2,6-diclorobencil)-indazol **35**

La reacción de alquilación del indazol **34** para dar lugar al *N*-diclorobencil derivado **35**, estaba descrita con un 33% de rendimiento utilizando bromuro de 2,6-diclorobencilo (1 eq.) como agente alquilante y KOH (1 eq.) como base^{152,212}. Cuando se repitieron estas condiciones de reacción en nuestro laboratorio, el producto deseado **35** se aisló puro con bajo rendimiento (34%). A la vista de este bajo rendimiento, se llevó a cabo el análisis detallado del crudo de reacción por HPLC, que mostró la presencia de un pico ($t_R = 3.17$

min, 57%), que correspondía al producto de *N*-alquilación buscado **35**, junto con otro pico ($t_R = 1.49$ min, 42%) que podía corresponder al indazol de partida **34**. A continuación, con el fin de incrementar el rendimiento de **35**, se llevó a cabo la reacción utilizando un 30% de exceso del agente alquilante y de base. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el HPLC de este crudo de reacción mostró que el rendimiento de **35** había disminuido hasta el 35% y que el pico correspondiente al producto de partida **34** había aumentado hasta el 64%. Con el fin de dar una explicación a lo que estábamos observando, se aisló el compuesto correspondiente al pico de $t_R = 1.49$. Estudios de RMN y HPLC-MS de esta fracción, mostraron que el compuesto aislado era **43**, producto de dialquilación tanto en el nitrógeno indazólico como en el pirrolidínico (Esquema 2.3). En TLC y HPLC, este producto coelúa junto con el compuesto de partida **34**. A la vista de este resultado, se llegó a la conclusión de que el bajo rendimiento obtenido en esta reacción era debido a la dialquilación del compuesto de partida **34**.



Con el fin de disminuir la proporción de alquilación en el nitrógeno pirrolidínico, se analizó la influencia de diferentes bases (KOH, Cs_2CO_3 , TEA y NaH) en la proporción de mono- (**35**) y dialquilación (**43**) utilizando 1 eq. de agente alquilante. Como se muestra en la Tabla 2.1, el máximo rendimiento para el producto de monoalquilación **35** se obtuvo con Cs_2CO_3 , aunque la reacción era significativamente más lenta. La TEA no solo produjo un mayor porcentaje del producto de dialquilación **43**, al igual que el NaH, sino que, además, dio lugar a mezclas de reacción más sucias. Teniendo en cuenta estos resultados, la alquilación se realizó con un equivalente de bromuro de 2,6-diclorobencilo en presencia de un equivalente de Cs_2CO_3 , aislándose el indazol monoalquilado en posición 1, **35**, en un 66% de rendimiento, que corresponde al doble del descrito.

Tabla 2.1. Optimización de la *N*-alquilación de **34**.

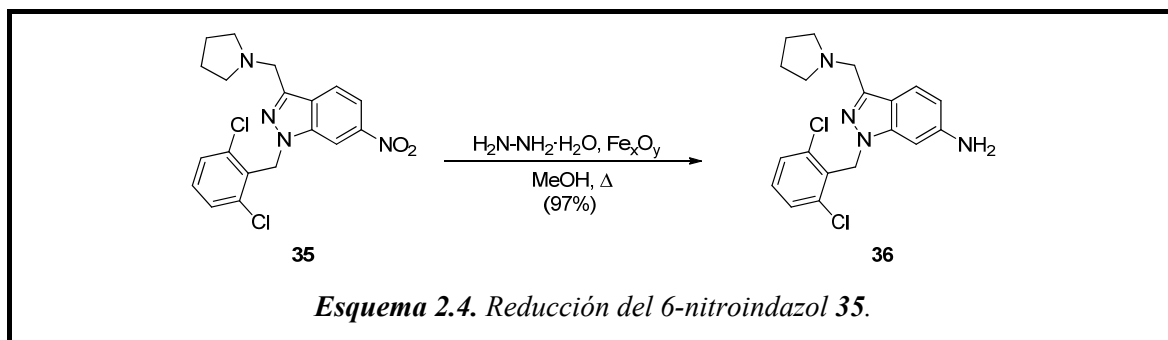
Base	t (h)	Rendimiento (%) ^a	
		35	34 + 43
KOH	4	57 (34) ^b	42
Cs ₂ CO ₃	24	80 (66) ^b	13
TEA	4	20	45
NaH	4	39	60

^aRendimientos calculados por HPLC en el crudo de reacción [Novapack C₁₈ (3.9 × 150 mm, 4 μm), isocrático (A:B) 50:50]. ^bRendimientos de compuesto aislado.

2.1.2. Reducción del 6-nitroindazol **35**. Síntesis del 6-aminoindazol **36**

Como ya se ha comentado, la preparación del 6-aminoindazol **36** estaba descrita mediante una metodología de reducción del correspondiente nitroindazol **35** por transferencia de hidrógeno, utilizando dimetilhidrazina como agente de transferencia de hidrógeno y FeCl₃·6H₂O como catalizador, obteniéndose el producto deseado **36** con un 75% de rendimiento^{152,212}. Sin embargo, al repetir esta metodología en nuestro laboratorio, el rendimiento obtenido fue ligeramente inferior (60%).

En la bibliografía se han descrito varios métodos de reducción de nitrocompuestos aromáticos mediante reducción por transferencia de hidrógeno, utilizando hidrato de hidrazina como agente de transferencia de hidrógeno y diferentes catalizadores, tales como óxidos de hierro, oxihidróxidos de hierro, sales de paladio o Ni-Raney²¹³⁻²¹⁵. De todos estos procedimientos, cabe destacar el procedimiento descrito por Lauwiner *et al.*²¹⁵, en el que para la reducción de nitroarenos se usa como catalizador un oxihidróxido de hierro (III), preparado por precipitación de FeCl₃·6H₂O en disolución de NaOH, cuya estructura cristalina no se conoce y a la que se le da la fórmula general de Fe_xO_y²¹⁵. En general, en este método se describen rendimientos cuantitativos (96-99%). Dados estos buenos resultados y la sencillez del procedimiento, se decidió estudiar su aplicación para la reducción del 6-nitroindazol **36**. De esta forma, utilizando hidrato de hidrazina como agente de transferencia de hidrógeno y Fe_xO_y (sintetizado según Lauwiner *et al.*²¹⁵) como catalizador en MeOH a reflujo, el 6-aminoindazol **36** fue obtenido con un 97% (Esquema 2.4).

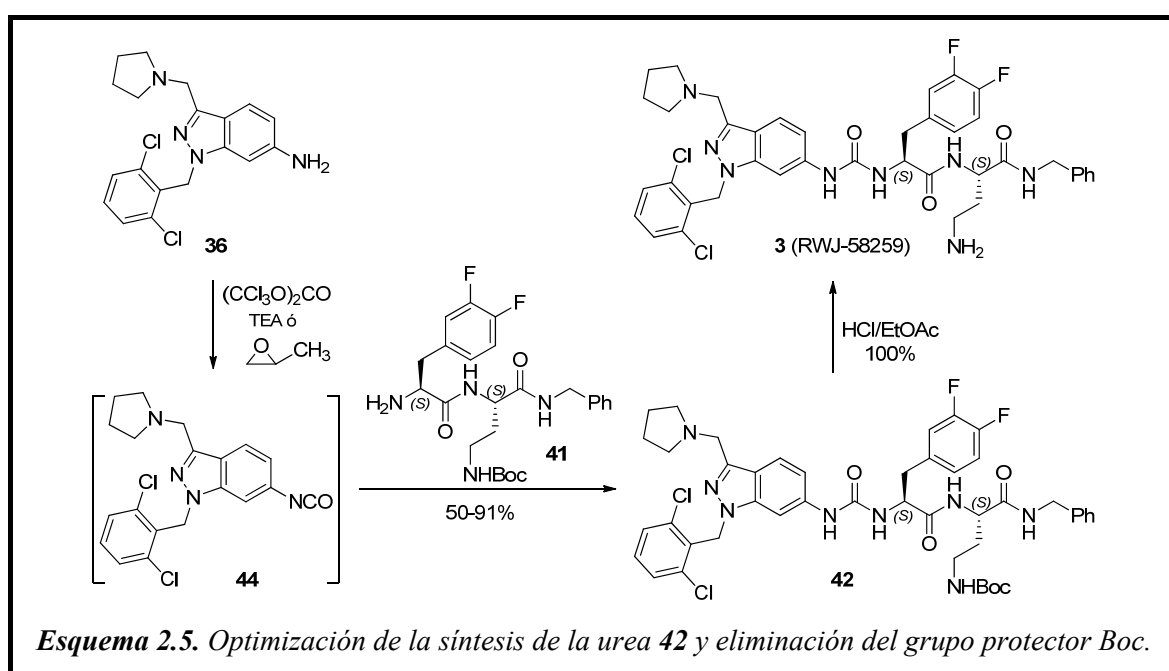


2.1.3. Optimización de la formación de la urea y eliminación del grupo protector Boc

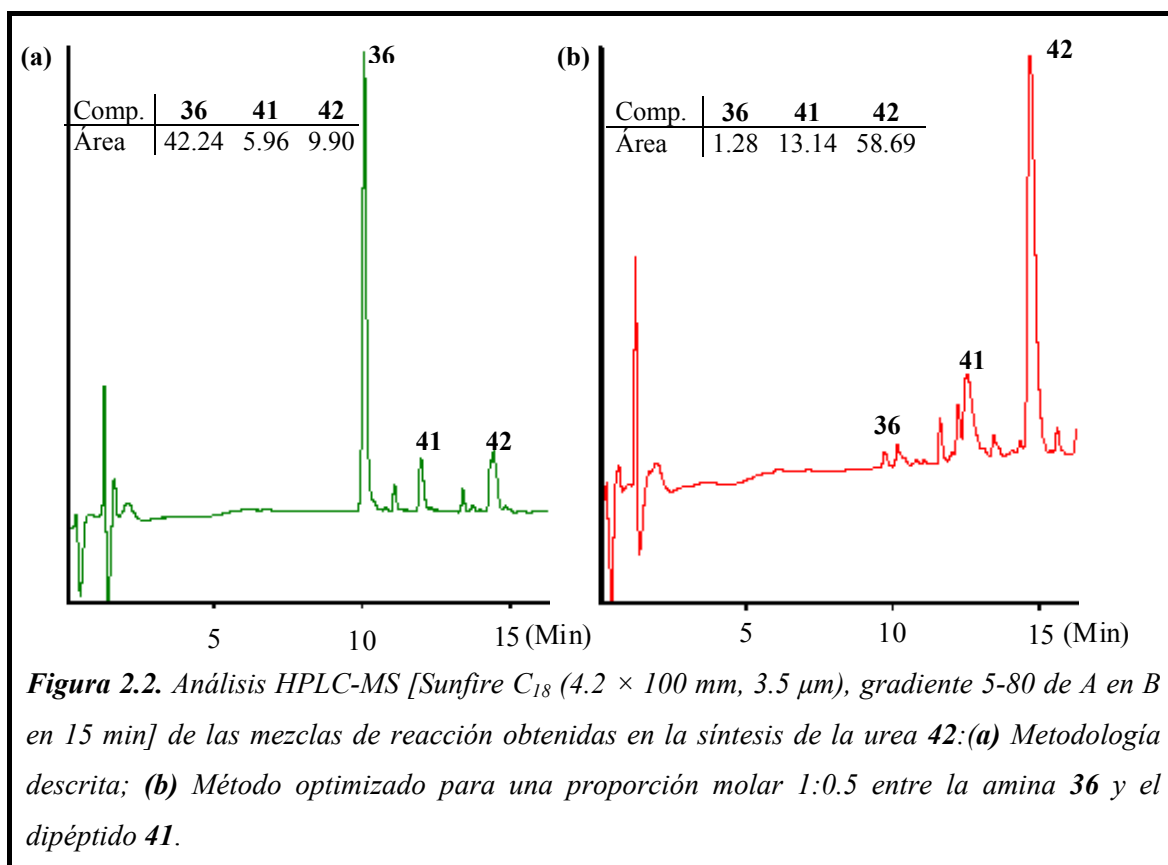
La metodología descrita para la síntesis de la urea **42** consistía en la formación *in situ* del isocianato del 6-aminoindazol **36** por reacción con cloroformiato de 4-nitrofenilo a -20°C en presencia de DIEA durante 30 min, seguida de reacción con el dipéptido **41**, para dar lugar a la urea **42**. Como ya se ha comentado, el rendimiento de esta urea fue del 10%, aproximadamente la mitad del descrito. Con el fin de mejorar este rendimiento, en primer lugar, se estudió la influencia de la temperatura (-40 , -20 , 0°C) y del tiempo de reacción (12 o 24 h), observando que ninguno de estos factores afectaban significativamente al rendimiento. A continuación, se decidió intentar una metodología alternativa, que había sido usada en nuestro laboratorio para la síntesis de ureas²¹⁶, consistente en la formación *in situ* del isocianato de uno de los dos fragmentos amino, por reacción a 0°C con carbonato de bistriclorometilo (trifosgeno) en presencia de TEA como aceptor de HCl, seguida de reacción con la otra amina. Cuando esta metodología se aplicó para la formación del isocianato **44** (Esquema 2.5), seguida de reacción con 0.5 equivalentes del dipéptido **41**, la urea **42** precipitó en el medio de reacción en un 50% de rendimiento. Desafortunadamente, el espectro ^1H -RMN mostró la presencia de $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ en el precipitado de **42**. Se intentó eliminar este clorhidrato mediante sucesivos lavados del precipitado con agua y disolventes orgánicos (CH_2Cl_2 o EtOAc), aunque en todos los casos sin éxito.

A la vista del aumento significativo en el rendimiento de **42** conseguido utilizando trifosgeno para la formación de la urea, con el fin de evitar la formación de $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, se estudió la utilización de óxido de propileno como aceptor de HCl. Esta modificación dio resultados excelentes, ya que la urea **42** fue aislada por precipitación del medio de reacción con una pureza en HPLC superior al 95% y rendimientos del 91% con respecto al dipéptido **41**. Este rendimiento fue nueve veces superior al obtenido aplicando la

metodología descrita. El exceso del 6-aminoindazol **36** se recuperó del filtrado de la mezcla de reacción para poder reutilizarse en el proceso. Finalmente, con el fin de optimizar la eficacia de la reacción, se estudió también la influencia de la proporción molar entre la amina **36** y el dipéptido **41** (1:0.5, 1:0.7, 1:0.9) observándose que, aunque el rendimiento no variaba significativamente, cuando la proporción molar de dipéptido era superior a 0.5, éste coprecipitaba con la urea **42** y, en estos casos, la purificación de la mezcla de reacción requería cromatografía. En la Figura 2.2 se comparan los HPLCs de los crudos de reacción obtenidos por el procedimiento descrito (a) y por el optimizado (b).



Finalmente, la eliminación del grupo protector Boc se realizó cuantitativamente mediante tratamiento con una disolución 3N de HCl en EtOAc. A diferencia de cuando la desprotección se realiza con TFA/anisol^{152,212}, el aislamiento del hidrocloreuro de RWJ-58259 (**3**) no requirió cromatografía y fue obtenido con un 91% de rendimiento, con respecto a **41**, y pureza en HPLC superior al 95%.



2.1.4. Conclusiones

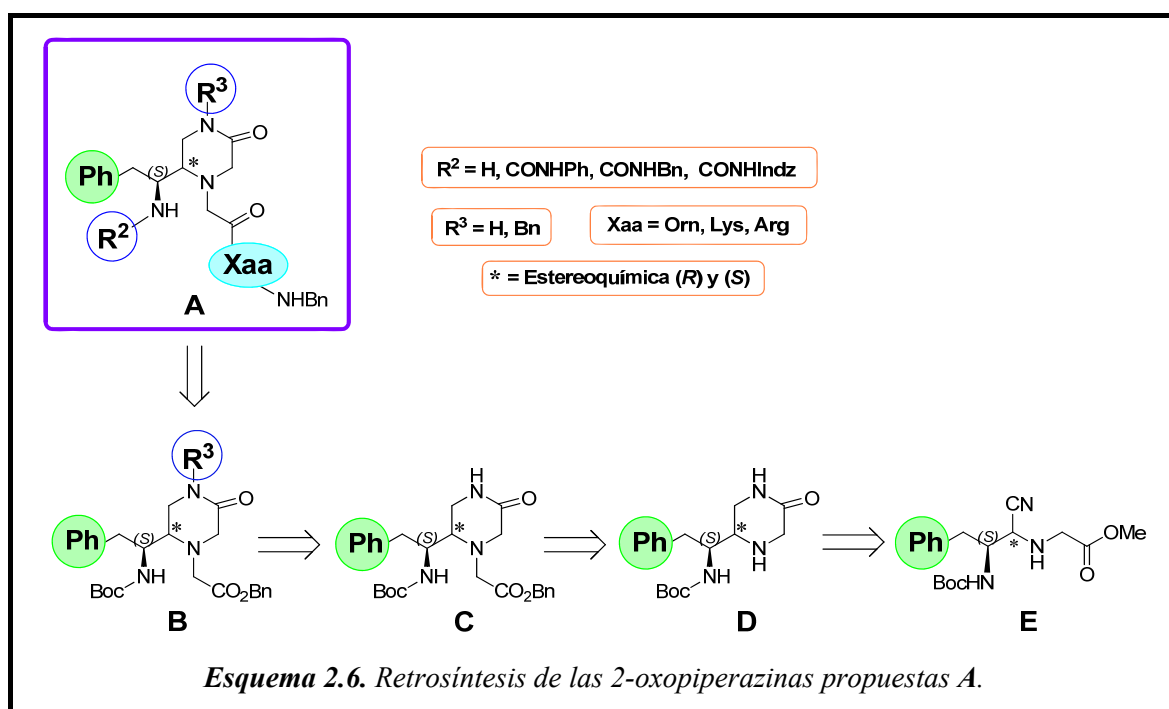
A continuación, se destacan las conclusiones más significativas del estudio de optimización de la síntesis del antagonista de referencia RWJ-58259.

- Los bajos rendimientos descritos para la alquilación del 6-nitroindazol **34** con bromuro de 2,6-diclorobencilo, utilizando KOH como base, son debidos a su dialquilación, tanto en el nitrógeno indazólico como en el nitrógeno pirrolidínico. La utilización de Cs_2CO_3 , en lugar de KOH, como base reduce considerablemente la formación del producto dialquilado **43**, duplicando el rendimiento con respecto al descrito.
- La reducción del 6-nitroindazol **35**, utilizando hidrato de hidrazina como agente de transferencia de hidrógeno y oxihidróxido de hierro (III) Fe_xO_y como catalizador, incrementa significativamente el rendimiento del correspondiente 6-aminoindazol **36** con respecto al descrito. Además, este método permite la obtención cuantitativa del producto evitando un paso de cromatografía. Estas mejoras suponen un aumento del rendimiento de la amina **36** del 60 al 97%.

- El uso de trifosgeno en presencia de óxido de propileno para la formación de la urea **42** da lugar a un rendimiento 9 veces superior al obtenido utilizando cloroformiato de 4-nitrofenilo en presencia de DIEA para la formación del isocianato derivbado del 6-aminoindazol **44**.
- La eliminación del grupo protector Boc utilizando una disolución 3 N de HCl en EtOAc da lugar a la obtención cuantitativa del hidrocloreuro del antagonista RWJ-58259, evitando su purificación cromatográfica.
- En conjunto, se ha conseguido una mejora significativa de la síntesis descrita para el antagonista de PAR1 RWJ-58259, mediante la optimización de 4 etapas de síntesis, que ha permitido aumentar el rendimiento global 29 veces con respecto al obtenido al aplicar la metodología previamente descrita.

2.2. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE Gly

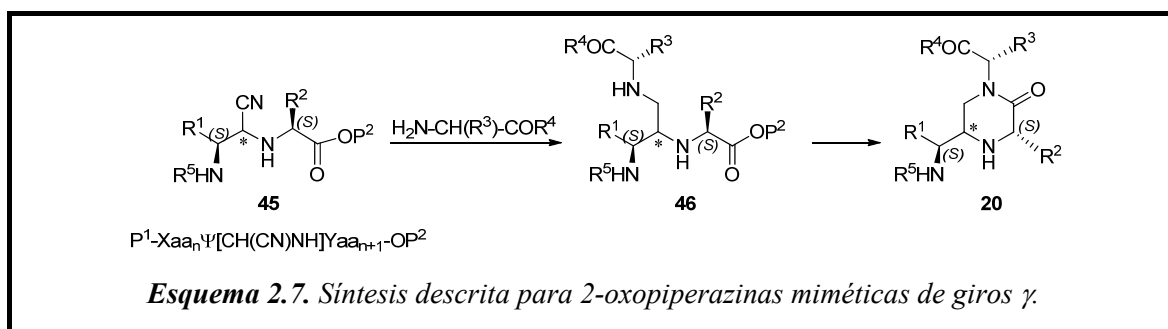
En este apartado se comentan los resultados relativos a la síntesis y evaluación biológica de la serie de derivados de 2-oxopiperazina de fórmula general **A** propuestos como objetivo en el Plan de Trabajo (apartado 1.4.2).



Tal como se muestra en el Esquema retrosintético 2.6, la síntesis de estas estructuras se planteó utilizando los pseudodipéptidos cianometilenamino derivados de Phe-Gly **E** como productos de partida e implicaba: a) reducción-lactamización para la

construcción del anillo de 2-oxopiperazina de **D**; b) funcionalización selectiva de las posiciones 4 y 1 de la piperazina (**C** y **B**); c) Introducción secuencial, en el orden apropiado, del agrupamiento urea en el amino exocíclico y del aminoácido básico en el carbonilmetilo de la posición 4 de la piperazina.

Como se ha señalado en la Introducción (apartado 1.1.6), hace unos años, nuestro grupo ya utilizó pseudopéptidos cianometilenamino para la preparación de 2-oxopiperazinas 1,3,5-trisustituídas (Esquema 2.7, **20**) como miméticos de giros inversos γ en péptidos²⁰². La síntesis de estas 2-oxopiperazinas implicaba una alquilación reductora de ésteres metílicos de pseudopéptidos cianometilenamino, mediante hidrogenolisis catalizada por Pd(C) en presencia de aminoácidos *N*-desprotegidos, seguida de lactamización por calefacción. Esta metodología tenía el inconveniente de la variabilidad de los resultados, que dependían tanto del pseudopéptido de partida como del aminoácido que se inserta en N₁.

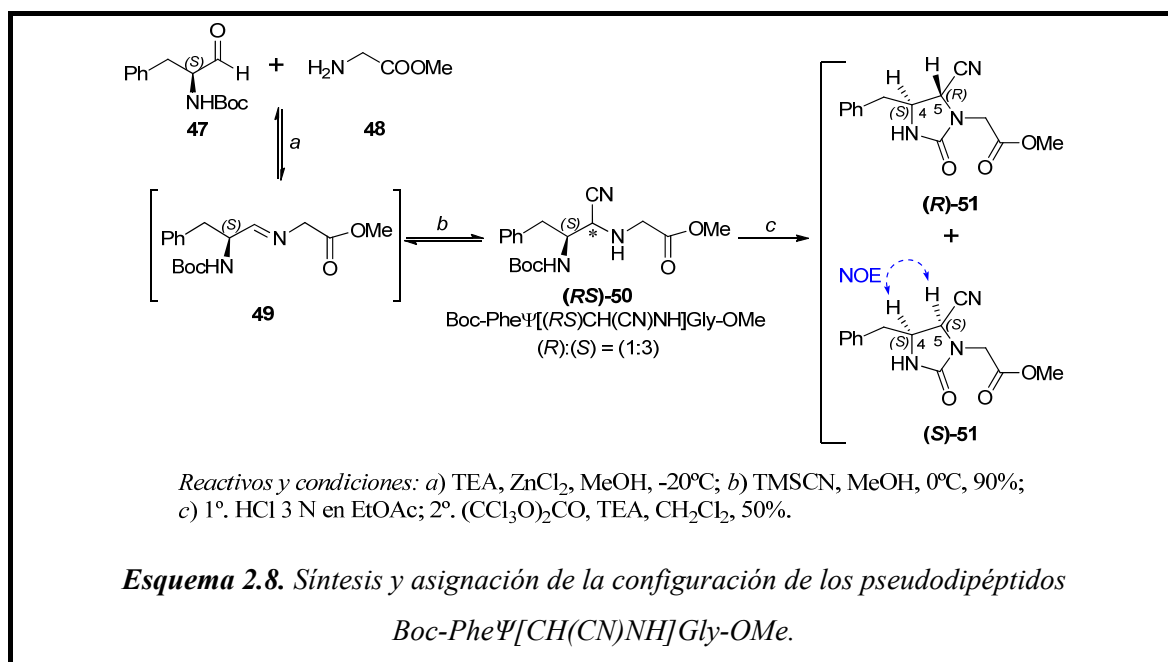


Teniendo en cuenta el precedente de la síntesis de las 2-oxopiperazinas **20**, para la preparación de las estructuras análogas **A**, propuestas como objetivo de esta tesis, se planteó una metodología similar, si bien, en este caso, como se pretendía sintetizar 2-oxopiperazinas tanto sustituidas como no sustituidas en posición 1, la introducción del sustituyente en esta posición se planteó con posterioridad a la etapa de reducción-ciclación.

2.2.1. Síntesis de los pseudipéptidos Boc-PheΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe

Los pseudodipéptidos de partida Boc-PheΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe [Esquema 2.8, (*RS*)-**50**] se prepararon aplicando la metodología desarrollada en nuestro laboratorio para la síntesis de pseudopéptidos cianometilenamino²¹⁷, que implica una reacción modificada

de Strecker, mediante adición *in situ* de cianuro de trimetilsililo (TMSCN) a la imina intermedia **49**, preformada a partir del aldehído Boc-Phe-H (**47**) y de H-Gly-OMe (**48**). En esta reacción, **(RS)**-**50** se obtuvo con un rendimiento del 90% en forma de mezcla de epímeros en el centro estereogénico generado, en proporción (*R*:*S*) = (1:3), que no pudo ser resuelta.



La configuración absoluta del nuevo centro estereogénico generado se asignó mediante la transformación de **(RS)**-**50** en la correspondiente mezcla de 2-imidazolidinonas **(RS)**-**51**. Esta transformación requirió la eliminación previa del grupo protector Boc en medio ácido, seguida de tratamiento con trifosgeno en presencia de TEA²¹⁷. En el espectro ¹H-RMN de la mezcla epimérica **(RS)**-**51**, el isómero mayoritario [**(S)**-**51**] mostró una constante de acoplamiento J_{4,5} de 8 Hz, indicativa de una disposición relativa *cis* para los protones 4-H y 5-H, mientras que, en el isómero minoritario [**(R)**-**51**] esta constante fue de 4.5 Hz, indicativa de una disposición relativa *trans*²¹⁷. Además, tal como se indica en el Esquema 2.8, esta asignación se confirmó por el efecto NOE observado entre dichos protones para el isómero mayoritario en el espectro NOESY 1D de la mezcla epimérica.

2.2.2. Síntesis de 2-oxopiperazinas derivadas de Boc-PheΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe

Una vez preparados los pseudodipéptidos Boc-PheΨ[CH(CN)NH]Gly-OMe, la construcción del anillo de 2-oxopiperazina, inicialmente, se abordó aplicando una metodología similar a la arriba comentada para la preparación de 2-oxopiperazinas 1,3,5-trisustituidas²⁰², que implicaba hidrogenación catalítica de la mezcla epimérica (**(RS)**-50, utilizando Pd(C) al 10% como catalizador a temperatura ambiente y 1 atm. de presión de H₂, con simultánea lactamización *in situ* (Esquema 2.9). En estas condiciones, tras 72 h de reacción, se observó la desaparición completa de los pseudodipéptidos de partida (**(RS)**-50 y las 2-oxopiperazinas deseadas (**(RS)**-53 fueron obtenidas en un 32% de rendimiento y en la misma relación epimérica inicial (3:1)[†]. A la vista de este bajo rendimiento se realizó un análisis HPLC-MS del crudo de reacción. En el cromatograma no se observaba la presencia de las aminas primarias (**(RS)**-52, primeros productos de la reducción. Junto a los picos correspondientes a los productos mayoritarios (**(RS)**-53, se observaban picos que, por su masa molecular, podrían corresponder con las 2-oxopiperazinas sustituidas en la posición N₁ (**(RS)**-54, (**(RS)**-55 y (**(RS)**-56, que no pudieron ser aisladas para su completa caracterización. La formación de (**(RS)**-56 podría explicarse por aminación reductora de los pseudodipéptidos (**(RS)**-50 con una molécula de las aminas primarias (**(RS)**-52 presentes en el medio de hidrogenación, seguida de lactamización, mientras que, la formación de (**(RS)**-54 y (**(RS)**-55 podría explicarse como resultado de reacción parcial de retro Strecker, en la cual los pseudodipéptidos (**(RS)**-50 revertirían parcialmente a Boc-Phe-H y H-Gly-OMe. En presencia de estos subproductos, la aminación reductora de (**(RS)**-50 con H-Gly-OMe, seguida de lactamización conduciría a (**(RS)**-54 y la alquilación reductora con Boc-Phe-H, seguida de lactamización conduciría a (**(RS)**-55.

Dado que la formación de los subproductos (**(RS)**-54, (**(RS)**-55 y (**(RS)**-56 podría ser consecuencia del elevado tiempo de reacción necesario para la desaparición completa de los pseudodipéptidos de partida, se estudió la hidrogenación en presencia de ácido acético o HCl para evitar la inactivación del catalizador y aumentar la velocidad de la reducción. Sin embargo, la presencia de medio ácido no afectó significativamente ni al tiempo ni al rendimiento de la reacción. Por ello, con el fin de mejorar el rendimiento, fue necesario llevar a cabo un estudio de condiciones de reacción (Tabla 2.2). La utilización de Ni Raney

[†] Hay que señalar que, tras la reducción, el orden de prelación de los sustituyentes sobre el centro estereogénico que soporta el grupo CN cambia, de forma que, el epímero (*R*) pasa a ser el (*S*) y viceversa.

como catalizador²¹⁸ (entrada 2), en lugar de Pd(C), a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ condujo en 5 h a las 2-oxopiperazinas **(RS)-53** con un rendimiento del 65%.

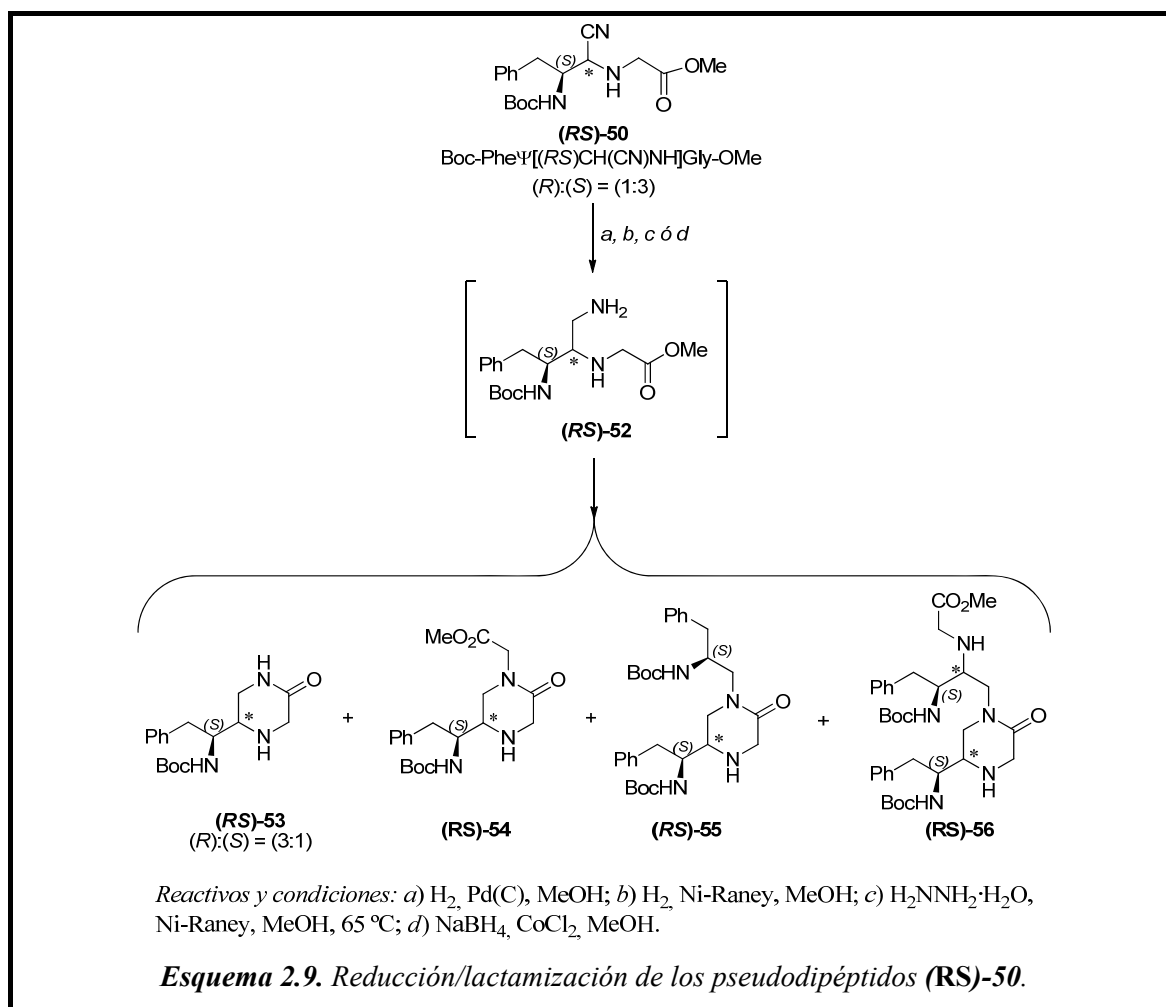


Tabla 2.2. Reducción/lactamización de los pseudodipéptidos **(RS)-50**.

Entrada	Reductor	Catalizador	Tiempo	(RS)-53 (%) ^a
1	H ₂	10% Pd(C)	3 días	32
2	H ₂	Ni Raney	5 horas	65
3	H ₂ N-NH ₂ ·H ₂ O	Ni Raney	1 hora	50
4	NaBH ₄	CoCl ₂	1 hora	15

^aRendimiento de compuesto aislado.

Como métodos alternativos a la hidrogenación catalítica, se estudió la reducción del grupo ciano por transferencia de hidrógeno, usando hidrato de hidrazina como generador de hidrógeno y Ni Raney como catalizador²¹⁹ y reducción con NaBH₄ en presencia de CoCl₂^{220,221}. Aunque en ambos casos, la reacción fue completa en 1 h, los rendimientos, 50 y 15%, fueron inferiores a los obtenidos por hidrogenación en presencia de Ni Raney, debido a la dificultad de aislamiento de los productos de reacción de la masa de subproductos inorgánicos que generan los reductores. A la vista de los resultados obtenidos, se decidió utilizar como condiciones óptimas para la reducción y lactamización *in situ* de los pseudopéptidos **(RS)-50** la hidrogenación catalítica en presencia de Ni Raney como catalizador, a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂. De esta forma, la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas **(RS)-53** se obtuvo con rendimiento doble al obtenido inicialmente utilizando Pd(C) como catalizador. Al igual que los pseudopéptidos de partida, esta mezcla epimérica tampoco pudo ser resuelta.

2.2.3. Funcionalización regioselectiva de las 2-oxopiperazinas **(RS)-53**

Una vez puesta a punto la síntesis de las 2-oxopiperazinas **(RS)-53**, dado que el posterior esquema sintético propuesto requería la funcionalización secuencial selectiva de las posiciones 1 y 4 del anillo de piperazina, se llevó a cabo un estudio previo sobre la reactividad de ambas posiciones para la introducción selectiva de diferentes sustituyentes en **(RS)-53**, tanto mediante alquilación como por reacción con isocianatos. En cuanto a la alquilación, en primer lugar, se estudió la reacción con bromoacetato de bencilo para la introducción del grupo benciloxycarbonilmetilo (Esquema 2.10). Para ello, inicialmente, se hizo un seguimiento de la reacción en paralelo, utilizando 1.1 equivalentes de agente alquilante a 60 °C y en presencia de tres bases habituales, NaH, con THF como disolvente, y Cs₂CO₃ o K₂CO₃, con CH₃CN como disolvente (Tabla 2.3, entradas 1-3). Cuando se utilizó NaH o Cs₂CO₃, la reacción requirió más de 5 días y, junto con el producto de monoalquilación en N₄ **(RS)-57**, se obtuvieron proporciones variables del producto de 1,4-dialquilación **(RS)-58**. Sin embargo, cuando la base fue K₂CO₃, tras 3 días de reacción, el producto de monoalquilación **(RS)-57** se obtuvo como único producto de reacción con un 90% de rendimiento. A la vista de estos resultados, con el fin de disminuir el tiempo de la monoalquilación en presencia de K₂CO₃, se estudió la activación de la reacción mediante irradiación con microondas a 100 y 150 °C (Tabla 2.3, entradas 4-8). Los resultados

indicaron la necesidad de aumentar hasta dos equivalentes la proporción de agente alquilante y base (entrada 8) para la completa reacción de la 2-oxopiperazina de partida y obtención de un 95% de monoalquilación **(RS)**-57, a pesar de que, con esta proporción de reactivos, se observaba también la formación de trazas del producto de dialquilación **(RS)**-58.

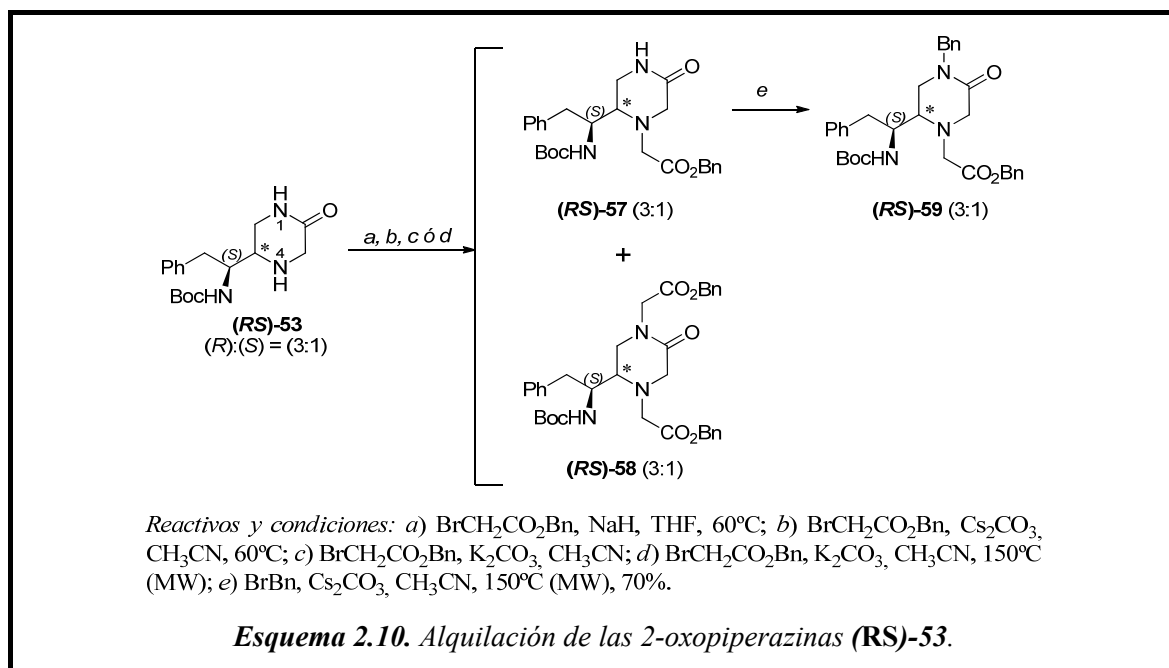


Tabla 2.3. Optimización de la alquilación regioselectiva en N_4 de las 2-oxopiperazinas **(RS)**-53.

Entrada	Base	Equivalentes		T ($^\circ\text{C}$)	t	Rendimiento (%) ^a	
		(RS)-53	Reactivos			(RS)-57	(RS)-58
1	NaH	1	1.1	60	6 días	43 ^b	5 ^b
2	Cs_2CO_3	1	1.1	60	5 días	67 ^b	17 ^b
3	K_2CO_3	1	1.1	60	3 días	89 ^b	0
4	K_2CO_3	1	1.1	100 (MW)	5 min	63	0
5	K_2CO_3	1	1.1	150 (MW)	5 min	70	0
6	K_2CO_3	1	1.1	150 (MW)	20 min	78	0
7	K_2CO_3	1	1.5	150 (MW)	10 min	90	0
8	K_2CO_3	1	2	150 (MW)	10 min	95	1

^aCalculados por HPLC [Sunfire C_{18} (4.6×150 mm, $3.5 \mu\text{m}$), gradiente 10-100 de A en B en 30 min]. ^bRendimiento de compuesto aislado.

A la vista de las dificultades de alquilación en el nitrógeno lactámico de la posición 1 del anillo de 2-oxopiperazina, puestas de manifiesto en el estudio previo de la monoalquilación, la optimización de condiciones de reacción para la introducción de un grupo bencilo en dicha posición en **(RS)-57** se realizó utilizando en todos los casos activación por microondas como fuente de calefacción a 150 °C. Esta 2ª alquilación se estudió utilizando 3 equivalentes de bromuro de bencilo como agente alquilante, CH₃CN como disolvente y diferentes bases, tanto metálicas (NaH, Cs₂CO₃ y K₂CO₃) como de tipo fosfaceno [*terc*-butilimino-tris(dimetilamino)fosforano, BEMP y BTPP] o DBU, controlando la reacción por HPLC-MS a los 10, 20 y 30 min. Al cabo de este tiempo, el compuesto de partida **(RS)-57** había desaparecido en todos los casos, excepto cuando se utilizó K₂CO₃ como base (Tabla 2.4, entrada 1), en el que, de acuerdo con los resultados comentados sobre la monoalquilación, fue recuperado inalterado. El bajo rendimiento observado cuando se utilizó NaH (entrada 2) fue debido a la formación de un alto porcentaje de productos de descomposición, que fue completa cuando se utilizó DBU (entrada 7). Tanto el Cs₂CO₃ como las bases de tipo fosfaceno (entradas 3-6) condujeron a las 1-bencilpiperazinas **(RS)-59** con rendimientos superiores al 90% en el HPLC del crudo de reacción.

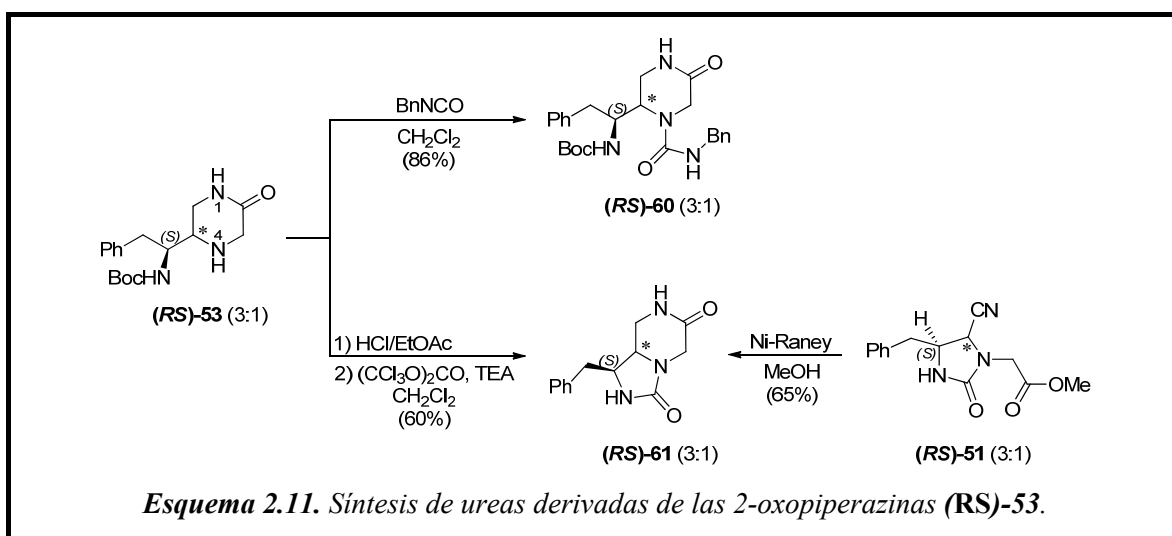
Tabla 2.4. Optimización de la bencilación de **(RS)-57** en el nitrógeno lactámico N₁.

Entrada	Base	Rendimiento (%) ^a
		(RS)-59
1	K ₂ CO ₃	0 ^b
2	NaH	28
3	Cs ₂ CO ₃	95 (70 ^c)
4	BEMP	93
5	BTPP	90
6	<i>terc</i> -Butilimino-tris(dimetilamino)fosforano	98 (75 ^c)
7	DBU	0 ^d

^aCalculados por HPLC-MS [Sunfire C₁₈ (4.6 × 50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100 de A en B en 5 min]. ^bEl compuesto de partida permaneció inalterado. ^cRendimiento de compuesto aislado. ^dEl compuesto de partida desapareció por completo.

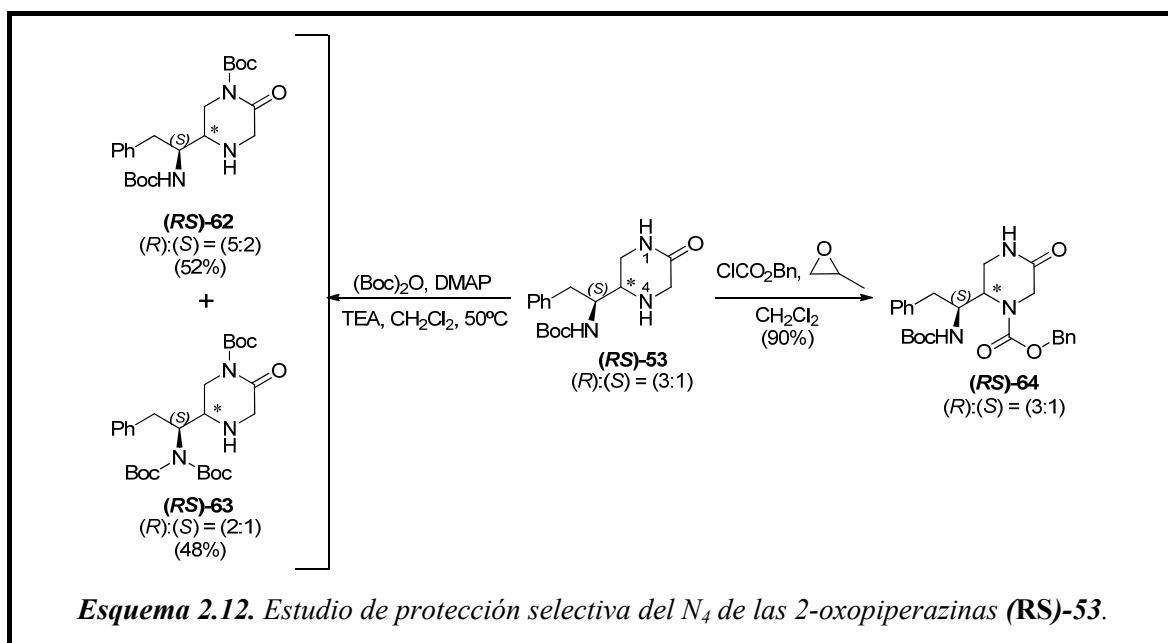
A la vista de los resultados anteriores, y teniendo en cuenta el menor coste y mayor facilidad de manipulación del Cs_2CO_3 , se seleccionó esta base para las sucesivas alquilaciones del nitrógeno lactámico.

En cuanto a la funcionalización por reacción con isocianatos, tal como se muestra en el Esquema 2.11, la reacción de la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas **(RS)-53** con isocianato de bencilo en CH_2Cl_2 también puso de manifiesto la mayor reactividad del N_4 , de tipo amino, que el N_1 , de tipo lactámico, dando lugar de forma regioespecífica a la correspondiente mezcla epimérica de las ureas **(RS)-60**. Por otra parte, la eliminación del grupo protector Boc en **(RS)-53**, seguida de reacción con trifosgeno en presencia de TEA, dio lugar a la formación de la urea endocíclica de las imidazopirazinas **(RS)-61**. Esta mezcla epimérica también fue obtenida mediante hidrogenación catalítica, con lactamización *in situ*, de las 2-oxoimidazolidinas **(RS)-51**, previamente sintetizadas para la asignación de la configuración en los pseudodipéptidos cianometilenamino iniciales.



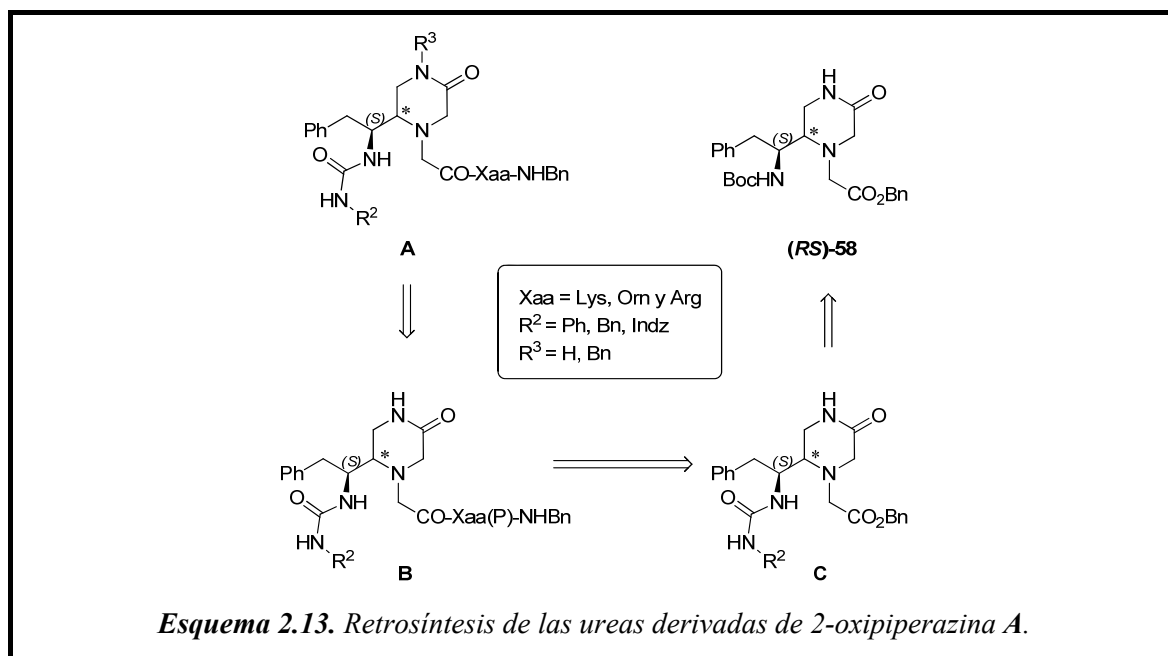
Teniendo en cuenta la mayor reactividad del nitrógeno amínico (N_4) que del lactámico (N_1) del anillo de 2-oxopiperazina, como alternativa para la funcionalización selectiva de la posición N_1 con respecto a la N_4 , se planteó la protección previa de esta última. Para ello, inicialmente, se seleccionó la protección Boc, por su facilidad de eliminación en condiciones ácidas suaves, simultáneamente con la eliminación del grupo Boc exocíclico presente desde el inicio del esquema sintético. Sin embargo, en las condiciones habituales de incorporación de esta protección en nitrógenos endocíclicos, es decir: reacción a temperatura ambiente con exceso de pirocarbonato de di(*terc*-butilo) en

CH_2Cl_2 y en presencia de TEA y DMAP²²², tras dos días, la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas **(RS)-53** fue recuperada inalterada. A continuación, se repitió la reacción a 50 °C. En este caso, al cabo de 4 h, la reacción fue completa, obteniendo un 52% de mezcla (5:1) de las 2-oxopiperazinas **(RS)-62** (Esquema 2.12), *N*-Boc-protegidas en posición 1, y un 48% de mezcla (2:1) del producto de entrada de dos grupos Boc **(RS)-63** (el primero entra en posición N_1 y el segundo entra en el grupo amino de la cadena lateral de la posición 5). Las posiciones de entrada del grupo Boc se asignaron en base a los datos de los espectros de ^1H -RMN y de ESI-MS. Los espectros ^1H -RMN de **(RS)-62** y **(RS)-63** indicaban la desaparición del protón de la posición N_1 . Además, en el espectro de **(RS)-63** no aparecían las señales correspondientes al NH-Boc de la cadena lateral en la posición 5. La entrada preferente del grupo Boc en el NH lactámico con respecto al NH amínico, así como la de un segundo grupo Boc en el grupo amino de la cadena lateral, indicaban un fuerte impedimento estérico en la posición 4 para la entrada de grupos voluminosos. Por lo cual, para proteger selectivamente esta posición, se contempló la utilización de grupos protectores menos voluminosos que el Boc, como el benciloxycarbonilo (Z). En este caso, la reacción de las 2-oxopiperazinas **(RS)-53** con cloroformiato de bencilo en CH_2Cl_2 , a temperatura ambiente y en presencia de óxido de propileno como aceptor de HCl, condujo de manera regioespecífica a la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas *N*-Z protegidas en N_4 **(RS)-64** con un 90% de rendimiento.



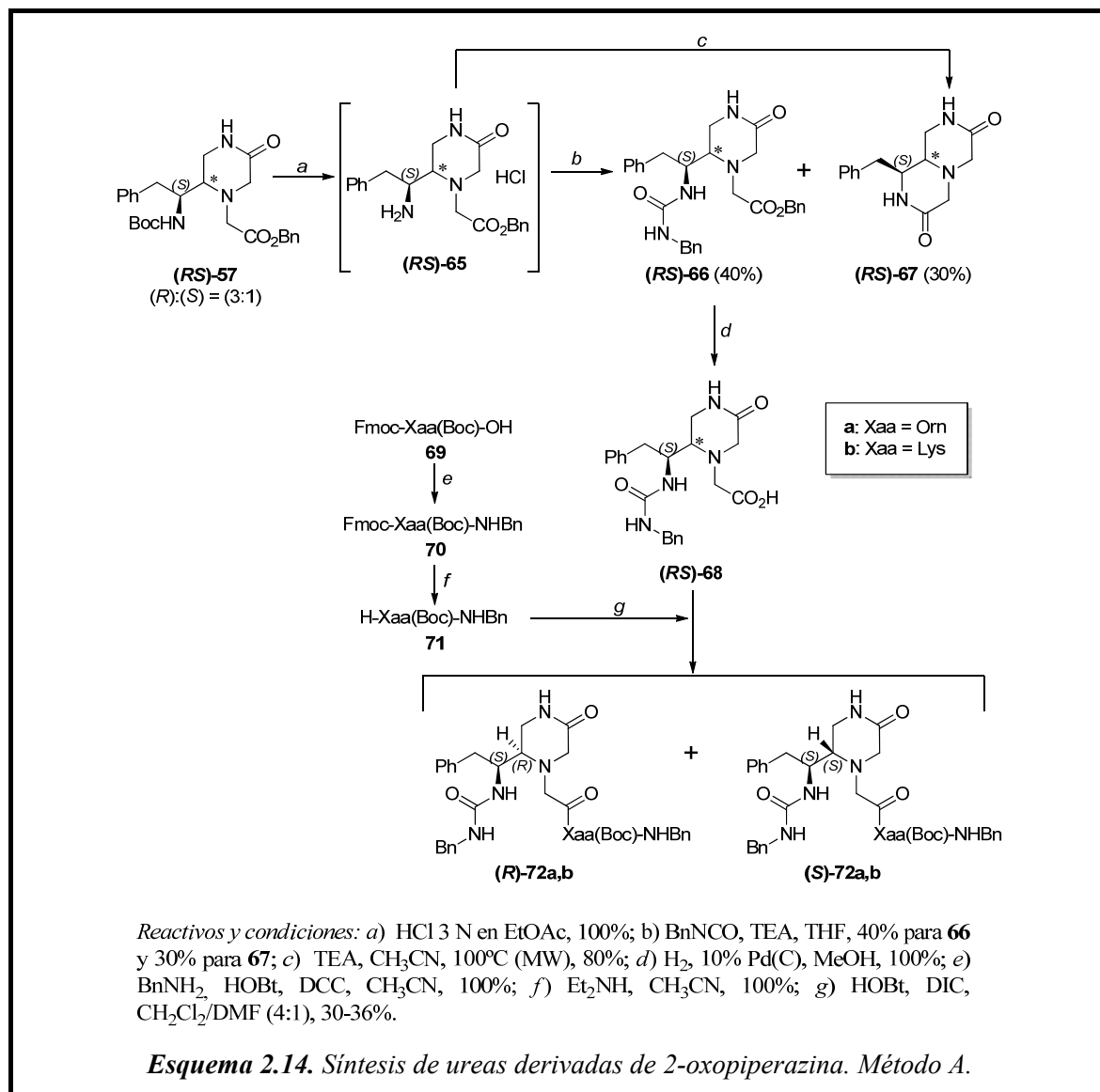
2.2.4. Síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en N₁

Tras estudiar la funcionalización selectiva de las posiciones N₄ y N₁ del anillo de 2-oxopiperazina, se abordó la síntesis de las ureas objetivo **A** no sustituidas en posición N₁ (Esquema 2.6, R³ =H). Para evitar problemas de ortogonalidad con el grupo protector en la cadena lateral de la posición 5 de las 2-oxopiperazinas de partida **(RS)**-**53** y el de la cadena lateral del aminoácido básico, inicialmente, tal como se muestra en el esquema retrosintético 2.13, se decidió introducir la urea en el agrupamiento de la posición 5 previamente al aminoácido en la posición 4.

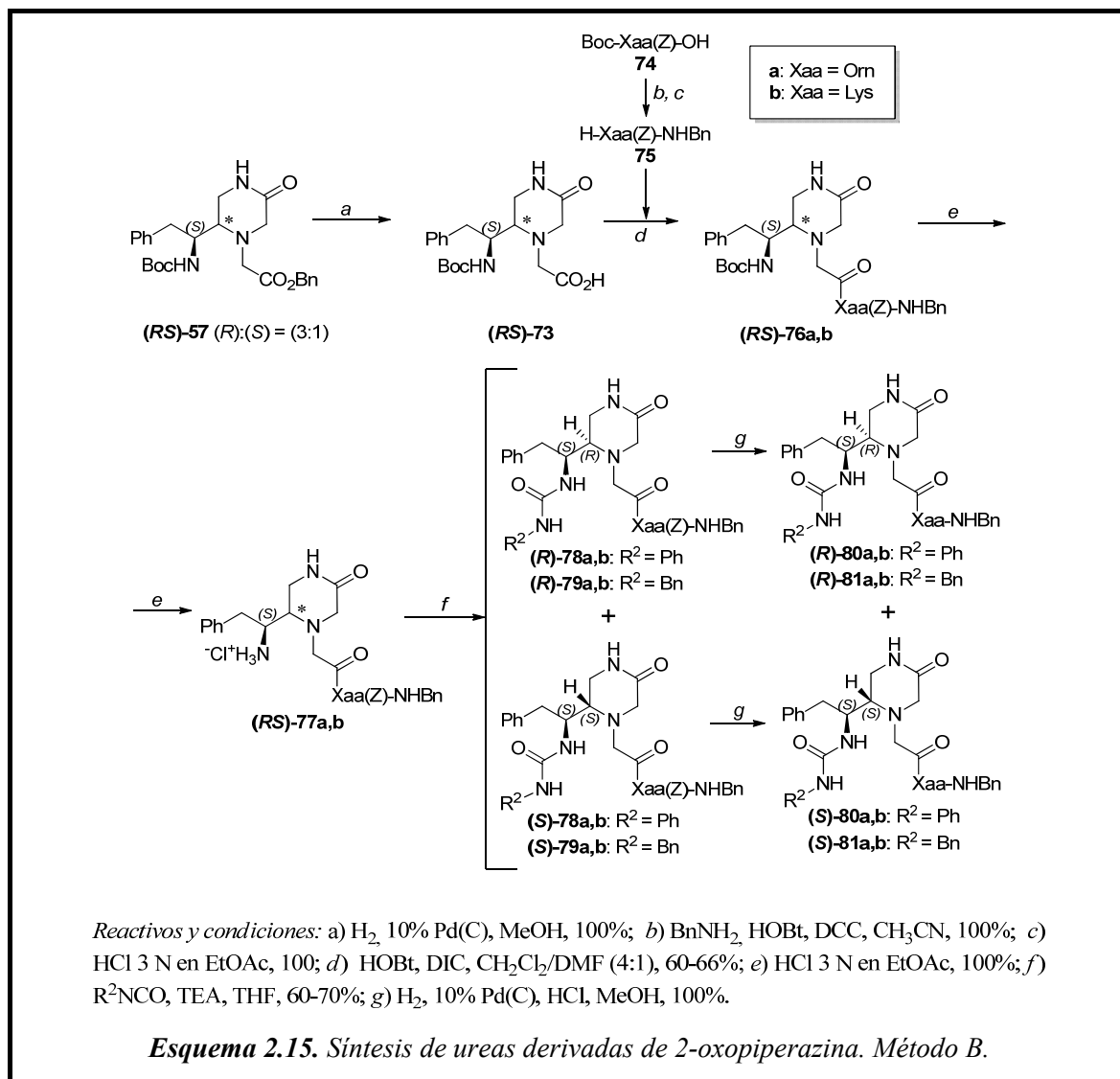


Con este fin, se aplicó la ruta de síntesis que se indica en el Esquema 2.14. La formación de la urea (R²-NHCONH) en el grupo amino exocíclico de la mezcla epimérica **(RS)**-**57** requería la eliminación del grupo protector Boc en medio ácido seguida de reacción con isocianatos (Esquema 2.14). La eliminación del grupo Boc se llevó a cabo por tratamiento con disolución 3 N de HCl en EtOAc, dando lugar a los correspondientes hidroclouros **(RS)**-**65**, que, tras liofilización, sin purificación adicional, fueron sometidos a reacción con isocianato de bencilo en presencia de un equivalente de TEA como aceptor del HCl. De esta forma, al cabo de 1 h de reacción, se obtuvo la mezcla epimérica de ureas deseadas **(RS)**-**66** en un 40%, junto con un 30% de los derivados de pirazino[1,2-*a*]pirazina **(RS)**-**67**, resultantes del ataque nucleófilo del grupo amino exocíclico de **(RS)**-**65** sobre el

grupo benciloxycarbonilo. Hay que señalar, que el análisis HPLC-MS de los hidrocloruros **(RS)-65** recién preparados y liofilizados ya mostraba trazas de la presencia de las pirazinopirazinas **(RS)-67**. Estos biclos fueron obtenidos cuantitativamente por calefacción de **(RS)-65** en microondas a 100 °C durante 30 min en presencia de TEA. Con el fin de minimizar la formación de los biclos en la síntesis de las ureas **(RS)-66** y mejorar el rendimiento de éstas, tanto la eliminación del grupo Boc como la posterior reacción con el isocianato de bencilo se realizaron a 0 °C, llevando a cabo esta segunda reacción inmediatamente después de la desprotección. Además, se utilizó exceso de isocianato (2 eq.) para forzar la formación de las ureas con respecto a la formación de las pirazinopirazinas. Sin embargo, en ninguno de los casos se consiguió mejorar significativamente el rendimiento de las ureas **(RS)-66**.

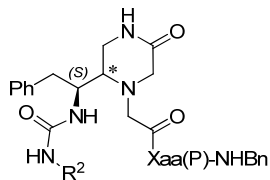


La hidrogenolisis del éster bencílico de **(RS)**-66, catalizada por Pd(C) al 10%, dio lugar, de forma cuantitativa, a los correspondientes ácidos libres **(RS)**-68. A continuación, el acoplamiento de estos ácidos con las bencilamidas derivadas de ornitina y lisina **71a** y **71b**, utilizando diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de activación, condujo a las correspondientes mezclas epiméricas de ureas pseudotripeptídicas **(RS)**-72a,b con 36 y 30 % de rendimiento, respectivamente. Estas mezclas epiméricas fueron resueltas cromatográficamente en sus epímeros (*R*) y (*S*), aunque, debido al bajo rendimiento global, los epímeros minoritarios **(S)**-72a,b no pudieron ser aislados en cantidad suficiente para su completa caracterización. A la vista de estos bajos rendimientos, la síntesis de las ureas propuestas **A** se abordó mediante la ruta alternativa B indicada en el Esquema 2.15.



La ruta alternativa B implicaba la introducción del aminoácido básico previamente a la formación de la urea en la posición exocíclica de la 2-oxopiperazina. Dado que en esta ruta la desprotección del grupo amino exocíclico, para la formación de la urea, se realiza con posterioridad a la introducción del aminoácido básico, la protección de la cadena lateral de éste debía ser ortogonal con la protección del agrupamiento de la posición 5. Por ello, con el fin de poder utilizar las 2-oxopiperazinas **(RS)-57**, ya sintetizadas, como intermedios de síntesis, se mantuvo la protección Boc en esta posición y para la cadena lateral del aminoácido se seleccionó la protección benciloxycarbonilo (Z). En primer lugar, se llevó a cabo la hidrogenolisis del éster bencílico de **(RS)-57**, catalizada por Pd(C) al 10%, que dio lugar, de forma cuantitativa, a los correspondientes ácidos libres **(RS)-73**. A continuación, el acoplamiento de estos ácidos con las bencilamidas derivadas de ornitina y lisina Z-protégidas **75a** y **75b**, respectivamente, utilizando las condiciones de reacción comentadas para la ruta A, condujo a las correspondientes mezclas epiméricas **(RS)-76**, con rendimientos comprendidos entre el 60 y el 70%. La posterior eliminación del grupo Boc en medio ácido, seguida de reacción con isocianato de fenilo o de bencilo en presencia de TEA, condujo a las respectivas ureas **(R,S)-78** y **(R,S)-79** con 60-70% de rendimiento. A lo largo de toda la ruta de síntesis la proporción de epímeros (3:1) se mantuvo, no siendo posible su resolución cromatográfica hasta después de la formación de las ureas **(R,S)-78** y **(R,S)-79**. Por último, se llevó a cabo la eliminación del grupo protector Z de la cadena lateral del aminoácido en cada uno de los epímeros por separado, mediante hidrogenolisis catalizada por Pd(C) al 10% en MeOH. Cuando esta hidrogenolisis se realizó en medio neutro, se observó la formación de productos de dimetilación en el grupo amino que se genera en la desprotección, debido a la alquilación reductora por el formaldehído que se forma por oxidación del MeOH en la superficie del catalizador²²³. Para disminuir el tiempo de hidrogenolisis y evitar la dimetilación, la hidrogenación se realizó en presencia de 2 equivalentes de HCl, obteniendo de esta forma los hidrocloruros de las ureas desprotegidas **(R)-**, **(S)-80a,b** y **(R)-**, **(S)-81a,b** con purezas superiores al 95% en HPLC sin necesidad de purificación adicional. La aplicación de esta ruta supuso triplicar el rendimiento global con respecto al de la ruta A (rendimiento global ruta A = 9-14%; rendimiento global ruta B = 36-46%).

Tabla 2.5. Comparación de los datos más significativos de HPLC y ¹H-RMN de las ureas derivadas de 2-oxopiperazinas **78a,b-81a,b**.



Comp.	Xaa	P	R ²	Conf. (*)	HPLC ^a t _R (min)	α-NH (Xaa) [δ, ppm]
(R)-78a	Orn	Z	Ph	(R)	20.30	7.88 ^b
(S)-78a	Orn	Z	Ph	(S)	21.41	7.97 ^b
(R)-78b	Lys	Z	Ph	(R)	20.64	7.90 ^b
(S)-78b	Lys	Z	Ph	(S)	21.76	8.09 ^b
(R)-79a	Orn	Z	Bn	(R)	20.79	7.99 ^b
(S)-79a	Orn	Z	Bn	(S)	20.09	8.14 ^b
(R)-79b	Lys	Z	Bn	(R)	21.05	7.97 ^b
(S)-79b	Lys	Z	Bn	(S)	20.47	8.15 ^b
(R)-80a	Orn	H·HCl	Ph	(R)	14.65	8.23 ^c
(S)-80a	Orn	H·HCl	Ph	(S)	15.07	8.21 ^c
(R)-80b	Lys	H·HCl	Ph	(R)	14.97	8.17 ^c
(S)-80b	Lys	H·HCl	Ph	(S)	15.21	7.92 ^c
(R)-81a	Orn	H·HCl	Bn	(R)	14.67	8.34 ^c
(S)-81a	Orn	H·HCl	Bn	(S)	15.01	8.30 ^c
(R)-81b	Lys	H·HCl	Bn	(R)	14.80	8.08 ^c
(S)-81b	Lys	H·HCl	Bn	(S)	15.34	8.05 ^c

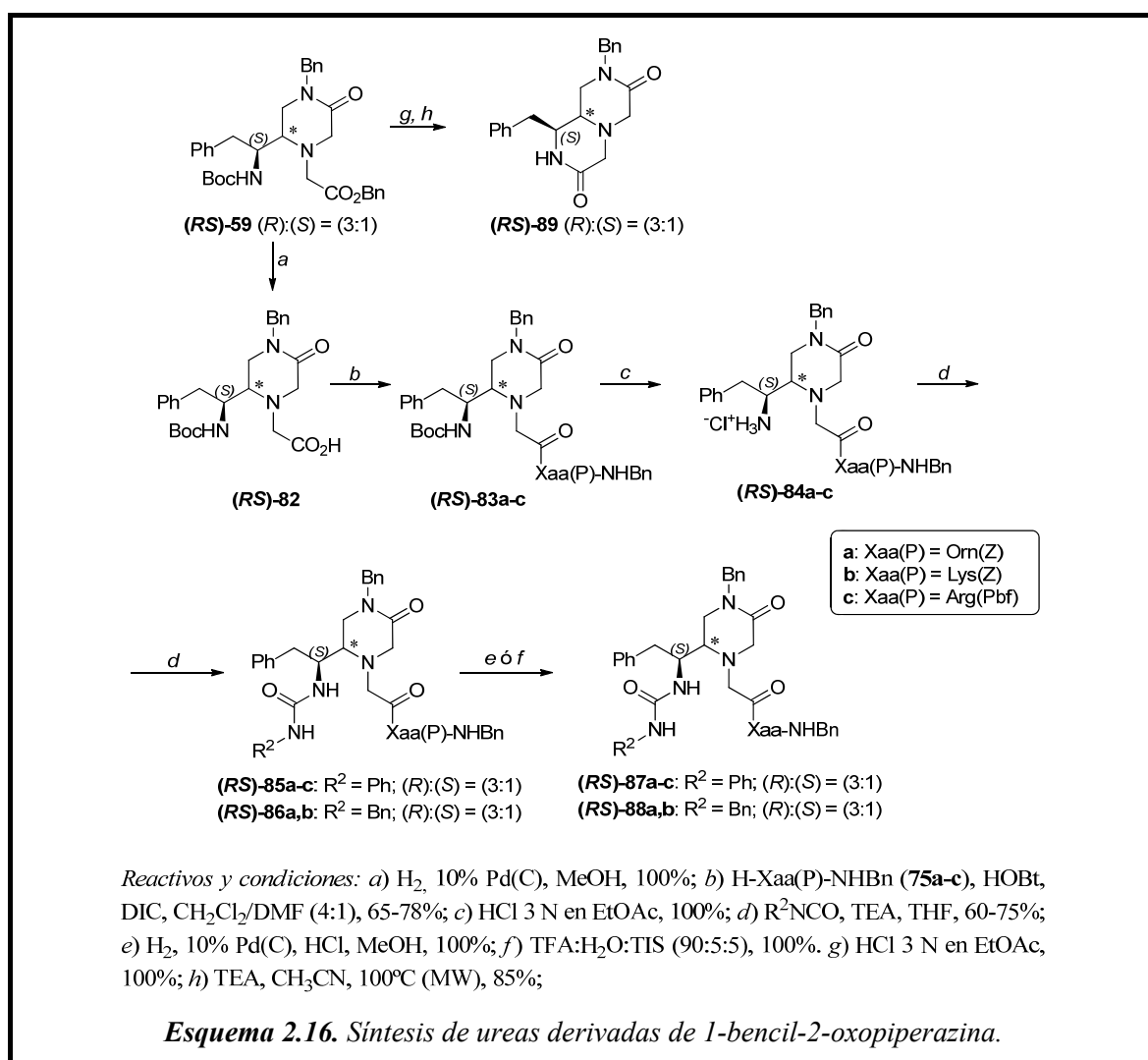
^aHPLC [columna Sunfire C₁₈ (4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 10-100% de A en B en 30 min]. ^bEspectros registrados a 400 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^cEspectros registrados a 500 MHz en DMSO-*d*₆, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC.

En la comparación de datos analíticos y espectroscópicos para las parejas de epímeros, en las ureas portadoras del aminoácido protegido en la cadena lateral con grupo Boc **72a,b** no se observaron diferencias significativas entre ambos epímeros. Sin embargo, en los análogos protegidos con el grupo Z **78a,b** y **79a,b** (Tabla 2.5), en HPLC se observó que la relación de tiempos de retención entre epímeros depende del sustituyente sobre la urea, fenilo [$t_R(R) < t_R(S)$] o bencilo [$t_R(R) > t_R(S)$]. En el ^1H -RMN de estas ureas, el NH_α del aminoácido aparece más apantallado (0.09-0.18 ppm) en el epímero (*R*) que en el (*S*). En las ureas portadoras del aminoácido desprotegido **80a,b** y **81a,b** el tiempo de retención del epímero (*R*) siempre fue menor (0.24-0.54 min) que en el (*S*) y en ^1H -RMN el desplazamiento químico del NH_α del aminoácido fue mayor (0.02-0.25 ppm) para el epímero (*R*) que en el (*S*).

2.2.5. Síntesis de ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas

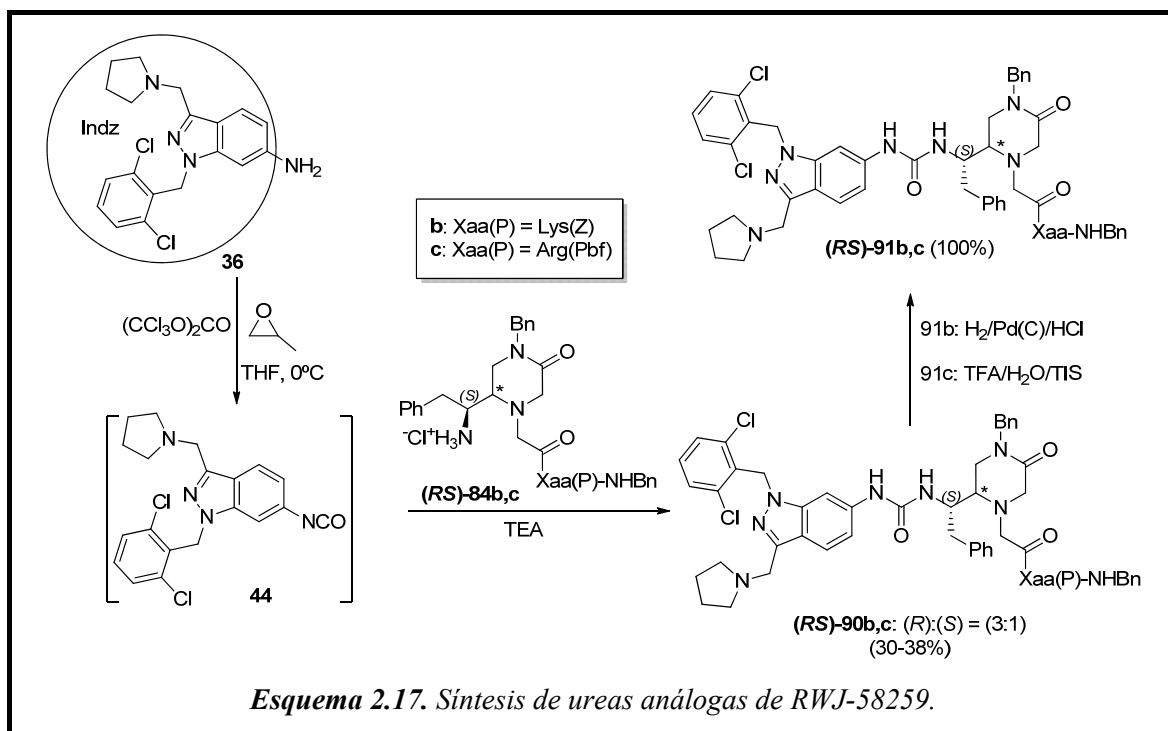
Las ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas (Esquema 2.6, **A**: $\text{R}^3 = \text{Bn}$) se prepararon a partir de la mezcla epimérica de 1-bencil-2-oxopiperazinas (***RS***)-**59**, aplicando un esquema de síntesis similar a la ruta B desarrollada para la síntesis de los análogos no sustituidos en N_1 comentada en el apartado anterior. Tal como se indica en el Esquema 2.16, la hidrogenolisis de los ésteres bencílicos en (***RS***)-**59** dio lugar a los respectivos ácidos (***RS***)-**82**, cuyo acoplamiento con el correspondiente aminoácido, ortogonalmente protegido en la cadena lateral, dio lugar a los pseudotripéptidos (***RS***)-**83a-c**. Hay que señalar que, teniendo en cuenta resultados biológicos de compuestos análogos preparados fuera del contexto de esta tesis²²⁴, que indicaban mejor actividad biológica para derivados de arginina, en esta serie de compuestos, además de introducir ornitina y lisina, se introdujo también arginina protegida en la cadena lateral con el grupo Pbf. La eliminación del grupo protector Boc de la cadena exocíclica en posición 5 del anillo de piperazina de (***RS***)-**83a-c** en las condiciones habituales, seguida de reacción con isocianato de fenilo o de bencilo, en presencia de TEA como aceptor de HCl, condujo a las mezclas epiméricas de las ureas (***RS***)-**85a-c** y (***RS***)-**86a,b**. Finalmente, la eliminación de la protección de la cadena lateral del aminoácido Xaa, Z en los derivados de ornitina (**a**) y lisina (**b**), mediante hidrogenolisis, y Pbf en arginina (**c**), mediante tratamiento con TFA, condujo a las correspondientes ureas desprotegidas (***RS***)-**87a-c** y (***RS***)-**88a,b**, con

rendimientos globales de 39-58% a partir de **(RS)**-59 y purezas en HPLC superiores al 95%. La proporción de epímeros (*R*)/(*S*) se mantuvo constante en (3:1) a lo largo de todo el proceso de síntesis, no siendo posible la resolución cromatográfica en ninguna de las etapas de la síntesis. En general, los epímeros mayoritarios (*R*) mostraron menor t_R (0-1.02 min) en HPLC que los minoritarios (*S*). En cuanto a los datos de ^1H -RMN, no fue posible identificar todas las señales correspondientes a los protones del epímero minoritario (*S*) en el espectro de la correspondiente mezcla epimérica. Por ello, no fue posible extraer conclusiones para la comparación de epímeros. Hay que señalar que, al igual que se ha comentado para los derivados de 2-oxopiperazina no sustituidos en N_1 **(RS)**-57, la eliminación del grupo Boc de **(RS)**-59 en medio ácido, seguida de calefacción en microondas en presencia de TEA, condujo a la correspondiente mezcla epimérica de 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas **(RS)**-89.



2.2.6. Síntesis de ureas análogas del antagonista PAR1 de referencia RWJ-58259

Como se ha indicado en la Introducción (Apartado 1.4.2), entre las ureas de formula general **A**, se planteó también la preparación de análogos del antagonista de referencia para los receptores PAR1 RWJ-58259, derivados de 2-oxopiperazina portadores del agrupamiento indazólico (Indz). A la vista de los resultados de inhibición de la agregación plaquetaria que se iban obteniendo, que parecían indicar mejores resultados para los derivados de 2-oxopiperazina 1-bencil sustituidos, se decidió introducir este agrupamiento en las ureas derivadas de **(RS)**-**84b,c**, aplicando la metodología de formación de ureas optimizada para la síntesis de RWJ-58259, que se ha comentado en el capítulo anterior (2.1). Para ello, tal como se muestra en el Esquema 2.17, previamente se sintetizó el isocianato derivado de indazol **44**, mediante adición lenta del 6-aminoindazol **36** sobre una disolución de trifosgeno (0.33 eq.) y óxido de propileno (2 eq.) en THF enfriada a 0 °C. A continuación, sobre esta disolución se adicionó la respectiva mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas **(RS)**-**84b,c**, dando lugar a las ureas protegidas en el aminoácido básico **(RS)**-**90b,c** en proporción de epímeros (*R*)/(*S*) = (3:1). Los derivados de lisina **(RS)**-**90b** fueron aislados en un 30% de rendimiento y los de arginina **(RS)**-**90c** en un 38%.



La eliminación de los respectivos grupos protectores Z y Pbf, en las condiciones anteriormente comentadas, condujo a las ureas desprotegidas análogas de RWJ-58259 (**RS**)-**91b,c**. Al igual que las ureas comentadas en el apartado anterior, ninguna de las mezclas epiméricas obtenidas en esta apartado pudieron ser resueltas.

2.2.7. Evaluación biológica

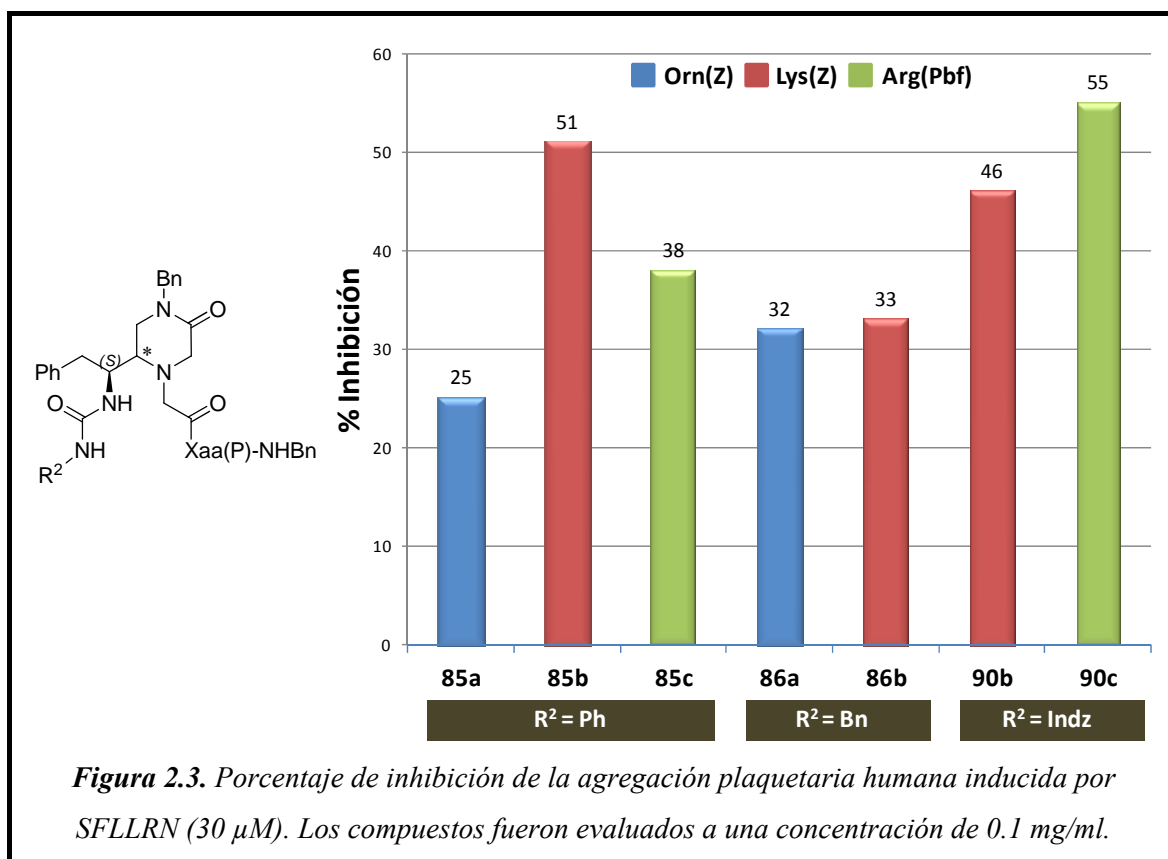
2.2.7.1. Evaluación de la actividad antagonista sobre receptores PAR1

Teniendo en cuenta que, como se ha comentado en la Introducción, el PAR1 humano se expresa principalmente en plaquetas y su activación por trombina induce agregación, con el fin de determinar la actividad antagonista sobre los receptores PAR1, las 2-oxopiperazinas de fórmula general **A**, objetivo de este capítulo, como los compuestos intermedios de su síntesis, fueron evaluados como inhibidores de la agregación de plaquetas humanas inducida por una concentración 30 μ M del agonista de referencia SFLLRN. Todos los compuestos fueron ensayados a una concentración inicial de 0.1 mg/ml (\approx 120-150 μ M). En este ensayo, el antagonista de referencia RWJ-58259, a concentración 10 μ M, inhibió un 98% la agregación plaquetaria.

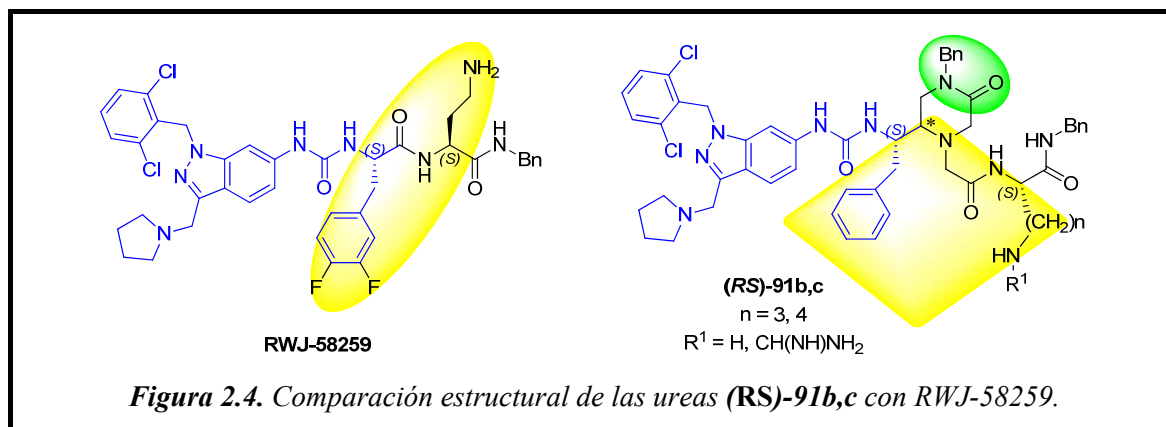
Ninguno de los compuestos desprotegidos en la cadena lateral del aminoácido Xaa **80a,b**, **81a,b**, **87a-c**, **88a,b** y **91b,c**, al igual que los derivados protegidos no sustituidos en la posición N₁ **72a,b** y **76a,b-79a,b** mostraron actividad inhibitoria significativa. Sin embargo, las mezclas epiméricas de derivados de 1-bencil-2-oxopiperazina protegidos en la cadena lateral del aminoácido **85a-c**, **86a,b** y **90b,c** inhibieron moderadamente la agregación de plaquetas (Figura 2.3). Aunque las pequeñas diferencias en el porcentaje de inhibición entre los diferentes compuestos, no permiten establecer relaciones estructura actividad claras, los resultados de los compuestos más activos (% inhibición \geq 30%) parecen indicar que, en lo que respecta a la influencia del aminoácido básico el orden de actividad es: Arg(Pbf) > Lys(Z) > Orn(Z). En lo que respecta al sustituyente sobre la urea el orden de actividad es: Indz > Ph > Bn.

La falta de actividad antiagregante de las ureas desprotegidas inicialmente propuestas, de formula general **A**, no ha permitido confirmar la validez de nuestra hipótesis de diseño de miméticos del exosito I de trombina como potenciales antagonistas de los

receptores PAR1. Sin embargo, la moderada actividad antiagregante sobre las plaquetas, mostrada por las ureas protegidas en la cadena lateral del aminoácido básico (**(RS)**-85b y (**(RS)**-90b,c, podría constituir un buen punto de partida para la optimización estructural en la búsqueda de nuevos antagonistas de PAR1.



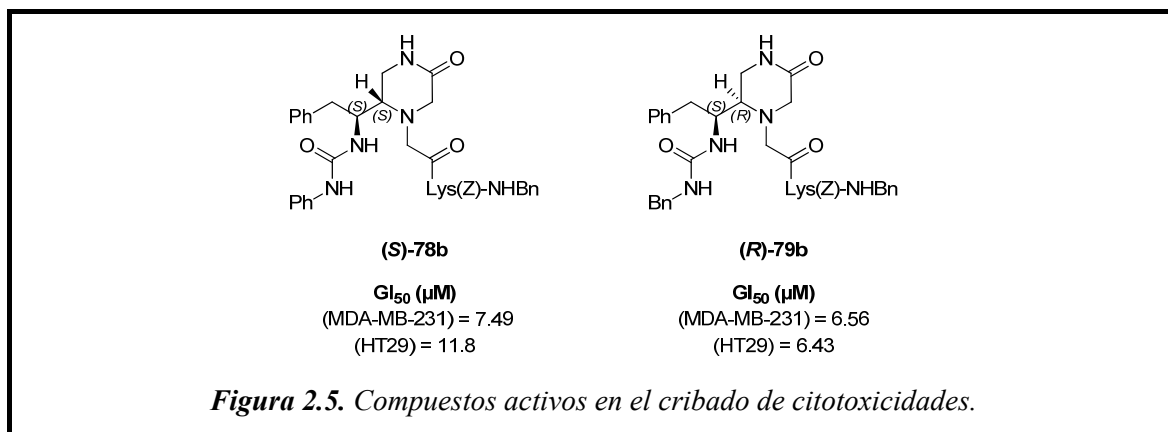
De acuerdo con los datos descritos para las ureas análogas de RWJ-58259, ni la presencia de flúor en el aminoácido aromático ni el tipo de aminoácido básico (Orn, Lys, Arg, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico) tienen una influencia importante sobre la actividad antagonista de PAR1¹⁵¹. Por ello, al comparar las ureas desprotegidas portadoras del agrupamiento indazólico (**(RS)**-91b,c con las ureas descritas análogas de RWJ-58259 (Figura 2.4), además del anillo de 1-bencil-2-oxopiperazina en (**(RS)**-91b,c, las principales diferencias estructurales responsables de la inactividad podrían ser: a) La sustitución del enlace peptídico por el anillo de piperazina que conlleva la pérdida de los grupos aceptor y dador de enlaces de hidrógeno que podrían participar en la interacción con el receptor; b) La separación entre el aminoácido aromático y el básico, debido a la introducción de un residuo de Gly adicional sobre el anillo de piperazina en (**(RS)**-91b,c.



Teniendo en cuenta la baja actividad mostrada por los compuestos en el cribado de agregación plaquetaria, éstos no fueron pasados a las evaluaciones subsiguientes inicialmente propuestas, comentadas en la Introducción (apartado 1.4.4).

2.2.7.2. Evaluación de la actividad citotóxica

Tal como se indica en la Introducción, todos los compuestos descritos en este capítulo, así como RWJ-58259, fueron incluidos en los ensayos HTS de citotoxicidad de la compañía PharmaMar, S. A. La citotoxicidad fue evaluada en tres líneas celulares de carcinoma humano representativas: mama (MDA-MB-231), pulmón (A549) y colon (HT29), empleando doxorrubicina como control y de acuerdo con los protocolos del Instituto Nacional del Cancer de Estados Unidos (NCI). El análisis de los datos fue realizado automáticamente por el sistema de gestión de información del laboratorio de HTS, determinando tres parámetros representativos del crecimiento celular: GI_{50} (concentración que inhibe al 50% el crecimiento celular), TGI (concentración que produce inhibición total del crecimiento celular) y LC_{50} (concentración que produce un 50% de muerte celular). En esta evaluación, exceptuando las ureas derivadas de Lys **(S)-78b** y **(R)-79b**, que mostraron citotoxicidades moderadas, indicadas en la Figura 2.5, ninguno de los compuestos descritos en este capítulo mostró citotoxicidad a la máxima concentración ensayada de 10^{-5} M.



2.2.8. Conclusiones

Del conjunto de resultados recogidos en este capítulo, se puede concluir:

- Utilizando los pseudodipéptidos Boc-Phe Ψ [CH(CN)NH]Gly-OMe como generadores de diversidad molecular se han sintetizado dos series de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas altamente funcionalizadas como potenciales antagonistas de los receptores PAR1, incluyendo análogos del antagonista de referencia RWJ-58259. Esta síntesis conlleva, entre otras, cuatro etapas de reacción significativas: a) una reducción seguida de lactamización de los aminonitrilos de partida, b) alquilaciones regioselectivas del anillo de 2-oxopiperazina, c) incorporación de un aminoácido básico, mediante acoplamiento peptídico, y d) formación de una urea en el agrupamiento de la posición 5.
- La hidrogenación catalítica a temperatura ambiente de Boc-Phe Ψ [CH(CN)NH]Gly-OMe, utilizando Ni Raney como catalizador, conduce directamente y con buen rendimiento a las correspondientes 2-oxopiperazinas sustituidas en posición 5, resultantes de la reducción del grupo ciano, seguida de lactamización *in situ*.
- Las 2-oxopiperazinas 5-sustituidas se alquilan primero en la posición amínica N₄ y, posteriormente, en la posición lactámica N₁. Este orden de reactividad se mantiene cuando se introducen grupos protectores pequeños (Z). Sin embargo, el grupo protector Boc entra primero en N₁ y, a continuación, en el NH-Boc de la cadena lateral en C₅. Este resultado pone de manifiesto la dificultad de introducir grupos voluminosos en la posición N₄. Por otra parte, la reacción con isocianatos conduce a ureas endocíclicas en esta posición.

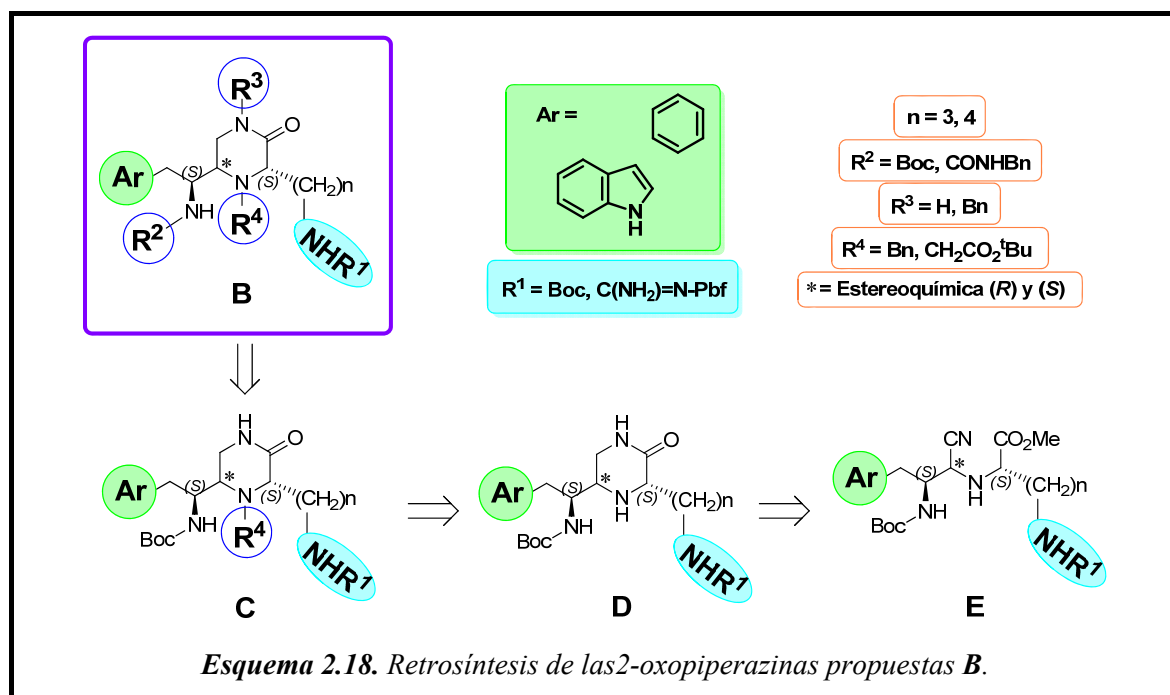
- En la eliminación de la protección Boc de la cadena lateral en C₅ en los derivados de 4-(benciloxycarbonil)metil-2-oxopiperazina se forman 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino-[1,2-*a*]pirazinas. Con el fin de evitar esta reacción secundaria, la eliminación del grupo Boc y formación de la urea debe realizarse con posterioridad a la introducción del aminoácido básico en el carbonilmetilo de la posición N₄. De esta forma, el rendimiento global se triplica con respecto a cuando la urea se incorpora previamente al aminoácido.
- Las ureas derivadas de 2-oxopiperazinas portadoras de aminoácidos básicos desprotegidos en la cadena lateral, propuestas como potenciales antagonistas de receptores PAR1, no inhiben la agregación de plaquetas humanas y, por tanto, no son antagonistas de PAR1. Sin embargo, las ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazina portadoras de aminoácidos básicos protegidos muestran moderada actividad antiagregante. Estos primeros indicios de actividad antagonista, junto con los que se comentan en el capítulo siguiente, podrían constituir una primera base para la obtención, mediante optimización estructural, de una nueva familia de antagonistas de PAR1.

2.3. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS

En este capítulo se comentan los resultados relativos a la síntesis y evaluación biológica de los derivados de 2-oxopiperazina propuestos en la figura 1.10, como serie **B**, portadores de cadenas laterales de aminoácidos básicos en la posición 3 del anillo de piperazina (Esquema 2.18). Teniendo en cuenta los resultados biológicos comentados en el capítulo anterior (Serie **A**), que indicaban una mejor inhibición de la agregación plaquetaria para derivados de arginina y lisina que para los de ornitina, en esta nueva serie de 2-oxopiperazinas **B**, la diversidad de estructuras se limitó a derivados de arginina y lisina. Además, a la vista de la falta de actividad biológica en los compuestos de la serie **A** desprotegidos en la cadena lateral del aminoácido básico, en la serie **B**, no se contempló dicha desprotección. Por otra parte, teniendo en cuenta que el triptófano está considerado el aminoácido preferente en interacciones proteína-proteína (está presente en el 21 % de los “hot spots” de interacción)²²⁵⁻²²⁷ y el que más contribuye a la energía libre de unión proteína-proteína y proteína-ligando^{228,229}, como residuo aromático, además de la fenilalanina, se contempló la preparación de derivados de triptófano, un aminoácido en el que el grupo de investigación posee amplia experiencia. En cualquier caso, la serie se planteó de una forma abierta a modificaciones sobre los sustituyentes en el anillo de 2-oxopiperazina, de acuerdo con los resultados de evaluación biológica que se fuesen obteniendo.

Tal como se muestra en el esquema retrosintético 2.18, la síntesis de los derivados de 2-oxopiperazina **B** se planteó utilizando como productos de partida los correspondientes

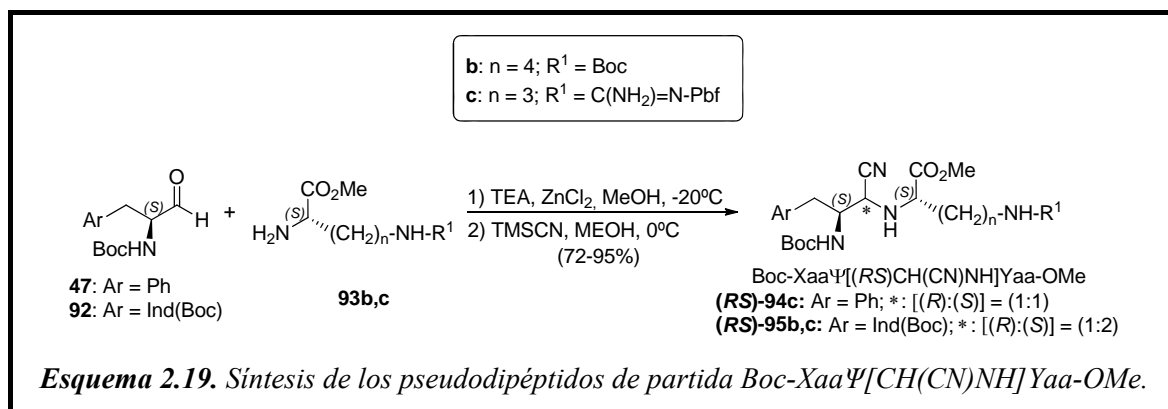
pseudodipéptidos derivados de aminoácidos aromáticos y básicos adecuadamente N- y C- protegidos de fórmula general **E**, aplicando un esquema general de síntesis similar al utilizado para la preparación de los derivados de Phe-Gly. Este esquema implica: a) reducción del grupo ciano, seguida de lactamización *in situ* para formar el anillo de 2-oxopiperazina de **D**; b) funcionalización selectiva en posición N₄ (**C**); c) introducción secuencial del agrupamiento bencilo en posición N₁ y del agrupamiento urea en el amino exocíclico (**B**).



2.3.1. Síntesis de pseudodipéptidos Boc-XaaΨ[CH(CN)NH]Yaa-OMe

Teniendo en cuenta el esquema sintético previsto, la síntesis de los ésteres metílicos de los pseudodipéptidos de partida de fórmula general **E** se proyectó utilizando protección Boc para el extremo N terminal y para la cadena lateral de lisina, mientras que, para la protección de la cadena lateral de arginina se planteó el grupo protector Pbf, protecciones lábiles en medio ácido de TFA, pero resistentes en los medios básicos necesarios para las alquilaciones previstas en las últimas etapas de síntesis. Además, teniendo en cuenta la reactividad del NH indólico del triptófano en estas reacciones de alquilación, con el fin de evitar su alquilación, también se utilizó protección Boc para dicho NH. Como se indica en

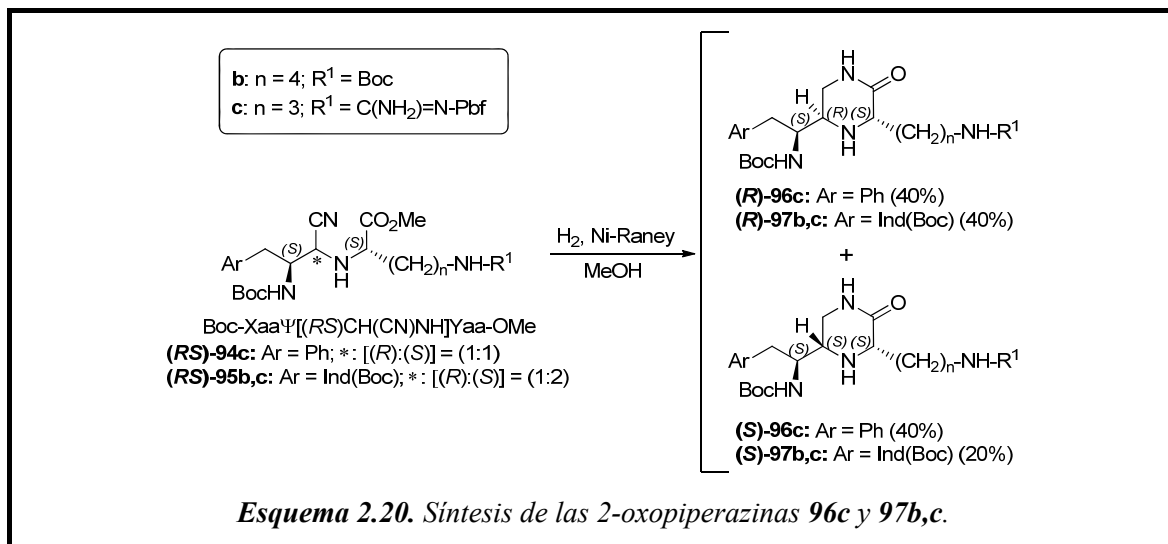
el Esquema 2.19, los pseudodipéptidos de partida Boc-XaaΨ[CH(CN)NH]Yaa-OMe se prepararon por reacción catalizada por ZnCl₂ de los aldehídos Boc-Phe-H (**47**) y Boc-Trp(Boc)-H (**92**) con los ésteres metílicos derivados de aminoácidos básicos H-Lys(Boc)-OMe (**93b**) y H-Arg(Pbf)-OMe (**93c**) a -20 °C, seguida de reacción *in situ* con TMSCN a 0 °C durante 24 h. De esta forma, se obtuvieron los α-aminonitrilos **94c** y **95b,c** como mezclas epiméricas que, al igual que en el caso de los pseudodipéptidos derivados de Phe-Gly comentados en el apartado 2.2.1, no pudieron ser resueltas cromatográficamente. En los derivados de fenilalanina **94c** no se observó estereoselectividad, obteniendo ambos epímeros en proporción (1:1), mientras que, en el caso de los derivados de triptófano **95b,c**, se observó una moderada estereoselectividad (1:2) hacia el epímero de configuración (*S*) en el centro quiral generado, independientemente de que el aminoácido básico fuese Lys(Boc)-OMe o Arg(Pbf)-OMe. Estos resultados indican la influencia de la naturaleza del aminoácido N-terminal sobre la estereoselectividad de la reacción y poca influencia de la naturaleza del aminoácido C-terminal.



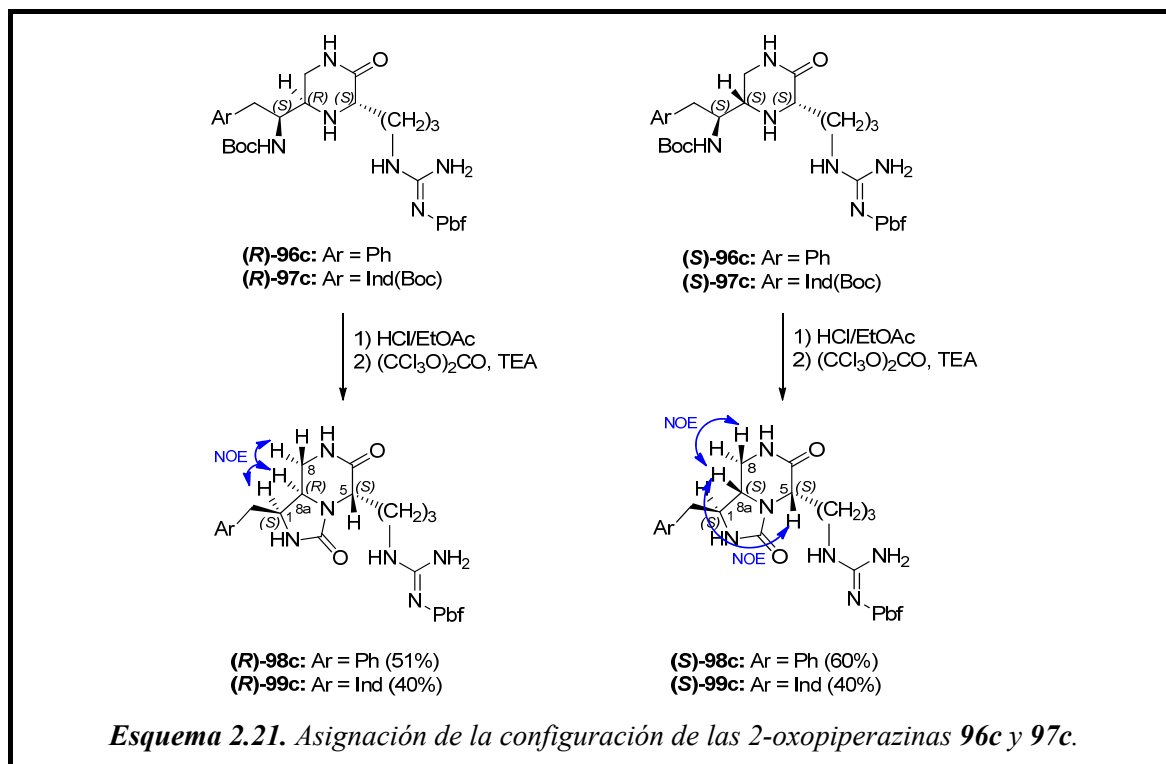
2.3.2. Construcción del anillo de 2-oxopiperazina

Una vez preparados los α-aminonitrilos (**RS**)-**94c** y (**RS**)-**95b,c**, su reducción seguida de lactamización, para obtener las correspondientes 2-oxopiperazinas, se llevó a cabo aplicando las condiciones optimizadas para la preparación de las 2-oxopiperazinas derivadas de Phe-Gly, comentadas en el apartado 2.2.2. Así, la hidrogenación catalítica, en presencia de Ni Raney como catalizador, a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ de (**RS**)-**94c** y (**RS**)-**95b,c** condujo a las 2-oxopiperazinas (*R*)-, (*S*)-**96c** y (*R*)-, (*S*)-**97b,c** con rendimientos globales comprendidos entre el 60 y 80% (Esquema 2.20). En todos los

casos, los epímeros fueron separados cromatográficamente en la misma proporción presente en las mezclas epiméricas de los α -aminonitrilos de partida.



El solapamiento de las señales correspondientes a los protones 3-H y 5-H de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c** en los espectros ^1H RMN no permitió asignar la configuración en el C_5 . Por ello, con el fin de elucidar esta asignación, se decidió fijar el sustituyente en esta posición, portador de un centro quiral de configuración conocida (*S*), en un anillo de 2-oxoimidazolidina fusionado con el anillo de piperazina, transformando las 2-oxopiperazinas en las respectivas 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas²⁰². Así, la eliminación del grupo protector Boc en las 2-oxopiperazinas derivadas de arginina, **(R)-**, **(S)-96c** y **(R)-**, **(S)-97c**, por tratamiento con disolución 3N de HCl en EtOAc, seguida de reacción con trifosgeno en presencia de TEA, condujo a las respectivas 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas **(R)-**, **(S)-98c** y **(R)-** y **(S)-99c** (Esquema 2.21). Hay que señalar que el tratamiento con medio ácido no afectó a la protección Pbf de la arginina. Sin embargo, en los derivados de triptófano **97c** este tratamiento produjo la eliminación de los dos grupos Boc, tanto del exocíclico como del protector en el indol. Aunque esta última no fue completa y, por ello, los rendimientos de **99c** fueron menores (40%) que los de los respectivos derivados de fenilalanina **98c** (51-60%).

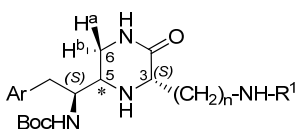


En los espectros NOESY 1D de los epímeros **(R)-98c** y **(R)-99c**, se observaron efectos NOE entre los protones 1-H y 8a-H, indicativos de una disposición relativa *cis* para estos protones y, por lo tanto, configuración (*R*) en C_{8a}, mientras que, en los correspondientes espectros de sus epímeros **(S)-98c** y **(S)-99c**, se observaron efectos NOE entre los protones 5-H y 8a-H, indicativos de una disposición relativa *cis* para dichos protones y configuración (*S*) en C_{8a}. Por otra parte, hay que señalar que en los espectros ¹H-RMN, **(R)-98c** y **(R)-99c** mostraron una constante de acoplamiento J_{1,8a} de 7 Hz, mientras que, en los respectivos epímeros **(S)-98c** y **(S)-99c** esta constante fue de 10 Hz. Estos valores no se corresponden con los valores esperados para 2-oxoimidazolidinas no fusionadas²¹⁷ comentados en el apartado 2.2.1, por lo que, en las 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas la asignación de configuración no se puede hacer basada en los valores de dichas constantes de acoplamiento.

En la comparación de los datos de ¹H-RMN para las parejas de epímeros de las 2-oxopiperazinas derivadas de arginina **96c** y **97c**, se observó que los dos protones 6-H de los epímeros (*R*) no eran equivalentes ($\Delta\delta_{H6a,H6b} \neq 0$), mientras que, en los (*S*) si lo eran (Tabla 2.6). Además, el protón 5-H en los epímeros de configuración (*R*) aparecía a campo más bajo (0.05-0.07 ppm) que en los epímeros (*S*). Por otra parte, en los espectros de ¹³C-RMN se observó que las señales correspondientes a los carbonos en posiciones 3 y 5 aparecían

2.5-3.8 ppm a campo más alto en el epímero (*R*) que en el (*S*). Además, la diferencia en el desplazamiento químico entre estos carbonos para un mismo epímero era mayor para las piperazinas de configuración (*R*) (4.7-5.0 ppm) que para las de configuración (*S*) (3.7-4.0 ppm). Estas diferencias entre ambos epímeros fueron utilizadas para la asignación tentativa de la configuración de las 2-oxopiperazinas análogas derivadas de lisina **97b**, en las que no era posible la transformación selectiva en 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas sin perder la protección Boc de la lisina.

Tabla 2.6. Comparación de los datos más significativos de RMN de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c**.



Comp.	n	Ar	R ¹	Conf. (*)	¹ H-RMN ^a		¹³ C-RMN ^b	
					5-H	Δδ _{6a-H,6b-H}	C ₃	C ₅
(<i>R</i>)- 96c	3	Ph	C(NH ₂)=N-Pbf	(<i>R</i>)	3.07	0.19	57.4	52.4
(<i>S</i>)- 96c				(<i>S</i>)	3.02	0	59.9	56.2
(<i>R</i>)- 97b	4	Ind(Boc)	Boc	(<i>R</i>)	3.17	0.21	56.7	52.0
(<i>S</i>)- 97b				(<i>S</i>)	3.12	0	59.7	55.7
(<i>R</i>)- 97c	3	Ind(Boc)	C(NH ₂)=N-Pbf	(<i>R</i>)	3.19	0.19	56.7	51.8
(<i>S</i>)- 97c				(<i>S</i>)	3.12	0	59.2	55.5

^aEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^bEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

2.3.3. Alquilación selectiva de la posición N₄ de 2-oxopiperazinas

La introducción de sustituyentes de forma selectiva en la posición N₄ de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c** se abordó de forma similar a como se ha comentado para la serie de 2-oxopiperazinas derivadas de Phe-Gly, utilizando la bencilación de (*R*)-**96c** con bromuro de bencilo como reacción modelo para la optimización de condiciones de reacción. En primer lugar, se aplicaron las condiciones de reacción optimizadas para la citada serie de 2-oxopiperazinas, es decir: reacción con 1.1 equivalentes de bromuro de

bencilo en CH₃CN a 60 °C, bajo atmósfera de argón, utilizando 1.1 eq. de K₂CO₃ como base (Tabla 2.7, entrada 1). Tras 24 h de reacción, el análisis por HPLC-MS del crudo de reacción mostró que solo se había formado un 28% del producto alquilado (**(R)**)-**100c** (Esquema 2.22) y quedaba un 72% del compuesto de partida (**(R)**)-**96c** sin reaccionar. Este resultado indicaba que esta alquilación era significativamente más lenta que en los derivados de Phe-Gly y requería más cantidad de reactivo alquilante.

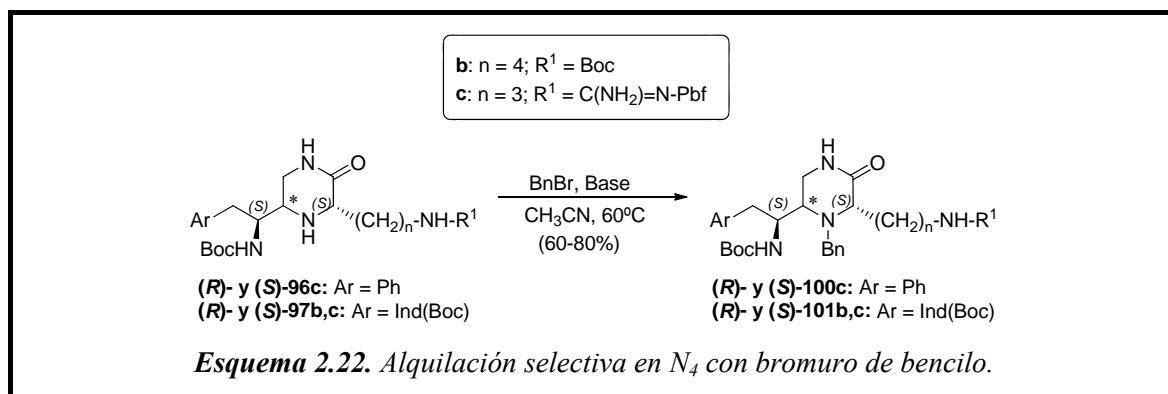


Tabla 2.7. Optimización de la alquilación regioselectiva de (**(R)**)-**96c** en N₄.

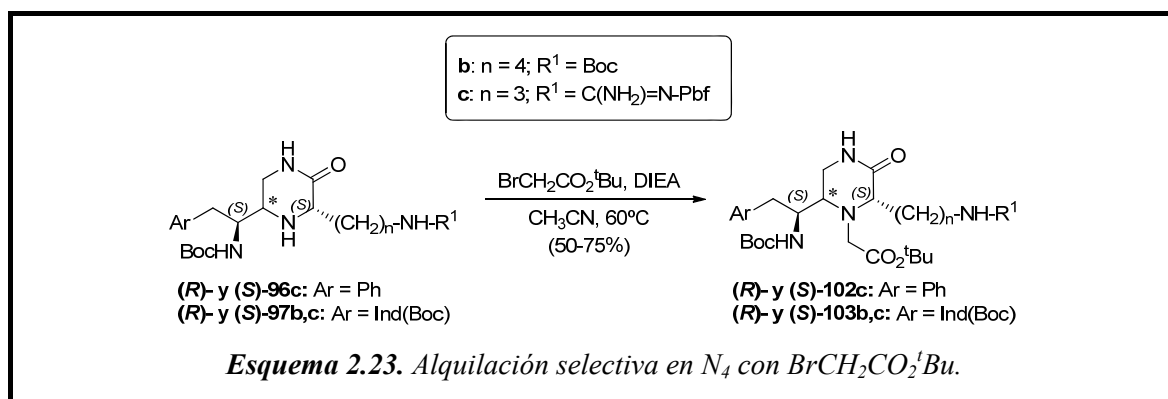
Entrada	Base	Eq. BnBr y Base	t (h)	(%) ^a	
				((R))- 96c	((R))- 100c
1	K ₂ CO ₃	1.1	24	72	28
2 ^b	K ₂ CO ₃	2.1	48	40	48
3 ^b	K ₂ CO ₃	3.1	72	10	68
4 ^b	K ₂ CO ₃	4.1	96	0	40
5	NaH	1.1	24	47	3
6	Cs ₂ CO ₃	1.1	24	53	7
7	DIEA	1.1	24	70	30
8 ^b	DIEA	2.1	48	41	59
9 ^b	DIEA	3.1	72	26	74
10 ^b	DIEA	4.1	96	0	85

^aCalculados por HPLC-MS [Sunfire C₁₈(4.6 × 50 mm, 3.5 μm), gradiente 10-95% de A en B en 10 min]. ^bDatos correspondientes a adiciones sucesivas de 1 eq. de base y BnBr cada 24 horas.

El aumento del número de equivalentes de BnBr desde el inicio de la reacción conducía a mezclas de reacción sucias. Por ello, con el fin de minimizar la degradación del BnBr y las reacciones secundarias, se añadió 1 equivalente adicional de alquilante y base cada 24 h (entradas 2-4). Con 2.1 y 3.1 equivalentes de BnBr, se obtuvo el producto monoalquilado (**R**)-**100** con rendimientos del 48 y 68%, respectivamente, quedando todavía un porcentaje importante de la 2-oxopiperazina (**R**)-**96c** sin alquilar. Sin embargo, con 4.1 equivalentes, ésta desapareció por completo, pero la reacción fue significativamente más sucia que en los casos anteriores, obteniéndose (**R**)-**100** con un 40% de rendimiento. A la vista de estos resultados, se planteó la utilización de otras bases, manteniendo la temperatura y el disolvente. Como bases se estudiaron NaH, Cs₂CO₃ y DIEA. Con 1.1 equivalentes de BnBr y base, cuando se utilizaron NaH o Cs₂CO₃ el análisis por HPLC-MS de los crudos de alquilación (Tabla 2.7, entradas 5 y 6) mostró crudos de reacción muy sucios y la formación del producto monoalquilado (**R**)-**100** con rendimientos muy bajos (3 y 7% respectivamente). Sin embargo, utilizando DIEA como base (Tabla 2.7, entrada 7), (**R**)-**100** se obtuvo con un 30% de rendimiento y quedaba un 70% del compuesto de partida inalterado. De forma similar a la alquilación con K₂CO₃, se fueron añadiendo 1 equivalentes de DIEA y BnBr adicionales cada 24 h de reacción (Tabla 2.7, entradas 8-10). Comparando estas reacciones con las realizadas con K₂CO₃, en todos los controles realizados cada 24 h, los crudos de reacción fueron significativamente más limpios. La reacción finalizó tras adicionar 4.1 eq. de reactivos y el compuesto deseado (**R**)-**100** se obtuvo con un rendimiento del 85%. A la vista de este resultado, se decidió que las alquilaciones en posición N₄ de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c** se llevarían a cabo a 60 °C utilizando DIEA como base, añadiendo 1eq. de agente alquilante y de DIEA cada 24 h hasta la desaparición de la 2-oxopiperazina de partida. De esta forma, la bencilación de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c** con BnBr bajo las condiciones optimizadas condujo a los compuestos bencilados selectivamente en N₄ **100c** y **101b,c**, con 60-80 % de rendimiento (Esquema 2.22). En general, los rendimientos obtenidos para los epímeros de configuración (*R*) fueron mayores (70-80%) que para los (*S*) (60-80%). Posiblemente, en este epímero los sustituyentes en las posiciones 3 y 5, orientadas hacia la misma cara del anillo de piperazina, dificultan más el ataque nucleófilo al BnBr.

Por otra parte, utilizando bromoacetato de *terc*-butilo como agente alquilante y aplicando las condiciones de alquilación optimizadas, se obtuvieron las 2-oxopiperazinas portadoras del grupo *terc*-butoxicarbonilmetilo en N₄ **102c** y **103b,c** (Esquema 2.23) con

rendimientos comprendidos entre el 50-75%. En este caso, fue necesario la adición de 5.1 eq. de DIEA y de bromoacetato de *terc*-butilo, para la desaparición completa de las piperazinas de partida. De manera similar a la bencilación, los rendimientos de los epímeros (*R*)-**102c** y (*R*)-**103b,c** fueron superiores (65-75%) que para los correspondientes epímeros (*S*)-**102c** y (*S*)-**103b,c** (50-70%).



Al igual que en las 2-oxopiperazinas no sustituidas en N_4 , el solapamiento de las señales de 3-H y/o 5-H no permitió extraer información de NOEs de los espectros ^1H RMN y NOESY 1D para el estudio conformacional del anillo de 2-oxopiperazina. En los espectros de ^1H -RMN de las 2-oxopiperazinas **100-103**, el protón 5-H en los epímeros (*S*), en los que los sustituyentes en posiciones 3 y 5 se encuentran en una disposición relativa *cis*, mostró constantes de acoplamiento de 6 y 13 Hz con los dos protones 6-H (Tabla 2.8). Estos valores indicaron una disposición pseudoaxial para 5-H y que el anillo de 2-oxopiperazina adoptaba una conformación preferente de tipo silla²⁰² (Figura 2.6, A), en la que los dos sustituyentes voluminosos de las posiciones 3 y 5 se situarían en posiciones pseudoecuatoriales.

En cuanto a los epímeros (*R*), en los que los sustituyentes en 3 y 5 se encuentran en disposición relativa *trans*, el comportamiento fue dispar. Así, tanto en los derivados de fenilalanina (*R*)-**100c** y (*R*)-**102c** como en los derivados de triptófano N_4 -bencilados (*R*)-**101b** y (*R*)-**101c**, las constantes de acoplamiento de 5-H con los 6-H fueron 4.5 y 12.5 Hz, indicativas también de una disposición pseudoaxial para 5-H, compatible con una conformación preferente de tipo bote, como **B**, o de tipo silla, como **C** (Figura 2.6). En la conformación de tipo **B**, el sustituyente en N_4 se situaría hacia la misma cara del anillo de 2-oxopiperazina que el protón 5-H y debería afectar significativamente al desplazamiento químico de este protón con respecto a cuando la posición N_4 no está sustituida. Sin

embargo, en la conformación **C** el sustituyente en N₄ se orientaría en la cara opuesta a la del 5-H. En este caso, la introducción del sustituyente no debería afectar significativamente al desplazamiento químico de 5-H. Cuando se analizaron los desplazamientos químicos de **(R)-100c**, **(R)-101b,c** y **(R)-102c**, en comparación con los de sus respectivos precursores **(R)-96c** y **(R)-97b,c**, se observó que la introducción de la sustitución en N₄ no afectaba significativamente al desplazamiento químico de 3-H, mientras que, en 5-H producía un desapantallamiento de 0.25-0.33 ppm (Tabla 2.8). Este importante desapantallamiento no se observaba en los epímeros (*S*), en los que, sí adoptan la conformación preferente **A**, el sustituyente en N₄ se situaría en la cara opuesta al 5-H. Estos datos apoyarían la preferencia por la conformación tipo bote **B** en **(R)-100c**, **(R)-101b,c** y **(R)-102c**. Por otra parte, en los análogos derivados de triptófano *N*₄-*terc*-butoxicarbonilmetil sustituidos **(R)-103b** y **(R)-103c**, aunque no fue posible extraer información de las constantes de acoplamiento del protón 5-H con los 6-H, debido al solapamiento de sus señales, los protones 6-H aparecían como equivalentes, hecho indicativo de movilidad conformacional en el anillo de 2-oxopiperazina entre las conformaciones **B-D** (Figura 2.6), sin mostrar preferencia por ninguna de ellas.

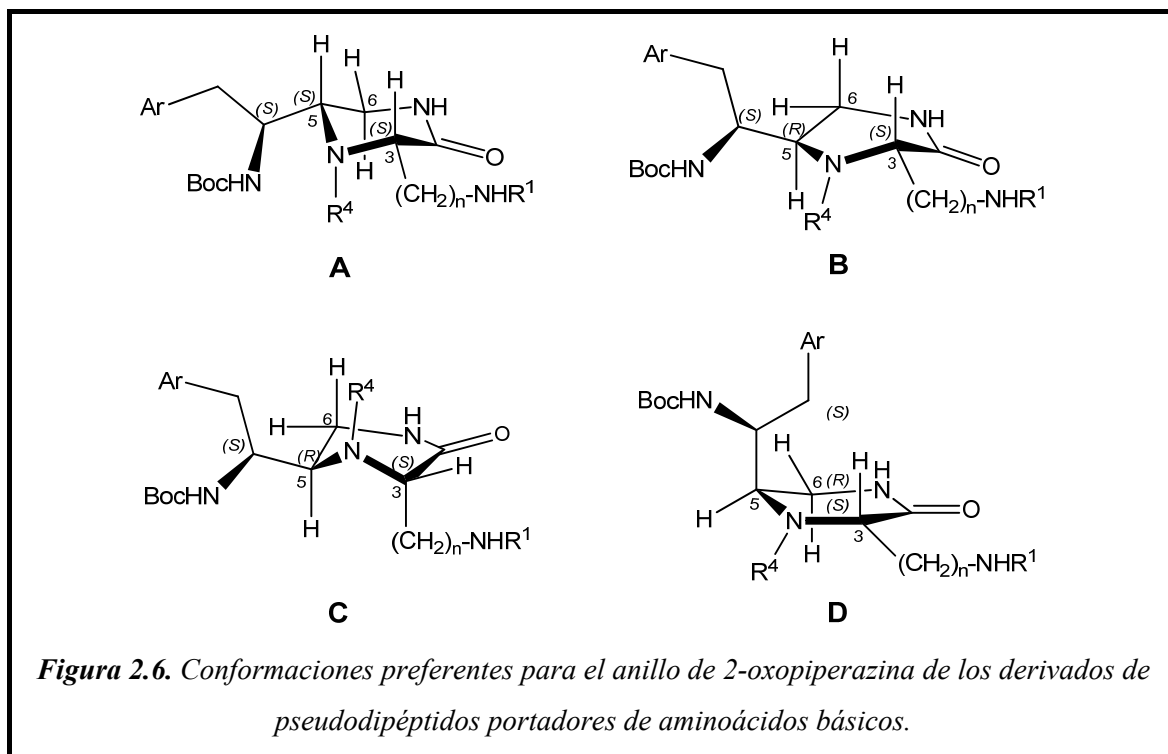
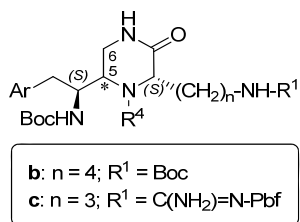


Tabla 2.8. Comparación de los datos más significativos de RMN de las 2-oxopiperazinas 4-sustituidas **100-103**.

Comp.	Ar	R ⁴	Conf. (*)	5-H ^a	J _{5,6} (Hz)	Conform. Preferente
(<i>R</i>)- 100c	Ph	Bn	(<i>R</i>)	3.40	4.5 y 12.5	B
(<i>S</i>)- 100c	Ph	Bn	(<i>S</i>)	3.00	6 y 13	A
(<i>R</i>)- 101b	Ind(Boc)	Bn	(<i>R</i>)	3.49	4.5 y 12.5	B
(<i>S</i>)- 101b	Ind(Boc)	Bn	(<i>S</i>)	3.14	6 y 13	A
(<i>R</i>)- 101c	Ind(Boc)	Bn	(<i>R</i>)	3.49	4.5 y 12.5	B
(<i>S</i>)- 101c	Ind(Boc)	Bn	(<i>S</i>)	3.14	6 y 13	A
(<i>R</i>)- 102c	Ph	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>R</i>)	3.32	4.5 y 12.5	B
(<i>S</i>)- 102c	Ph	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>S</i>)	3.19	6 y 13	A
(<i>R</i>)- 103b	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>R</i>)	3.39	-	B-D
(<i>S</i>)- 103b	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>S</i>)	3.27	6 y 13	A
(<i>R</i>)- 103c	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>R</i>)	3.40	-	B-D
(<i>S</i>)- 103c	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>S</i>)	3.21	6 y 13	A

^aEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC.

2.3.4. Bencilación de la posición N₁ de 2-oxopiperazinas

La puesta a punto de condiciones de reacción para la introducción de un grupo bencilo en la posición N₁ del anillo de 2-oxopiperazina se realizó en el derivado de fenilalanina y arginina (**R**)-**100c**. Inicialmente, se aplicaron las condiciones de reacción puestas a punto previamente en las 2-oxopiperazinas derivadas de Phe-Gly (apartado 2.2.3), es decir: reacción con bromuro de bencilo en CH₃CN, asistida por microondas a 150

°C, utilizando Cs_2CO_3 como base (Tabla 2.9, entrada 1). El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción puso de manifiesto la participación del grupo guanidino, a pesar de estar protegido, en la reacción de bencilación, obteniéndose 3 productos. Entre éstos el compuesto bencilado solo en N_1 **(R)-104c** era el minoritario (5%) y **(R)-106c**, bencilado en N_1 y en el grupo guanidino, el mayoritario (33%) (Esquema 2.24). A la vista de estos resultados, fue necesario optimizar las condiciones de reacción para minimizar la alquilación en el grupo guanidino. Para ello, aplicamos las condiciones de reacción puestas a punto de forma paralela para otros derivados de 2-oxopiperazina análogos, preparados en el laboratorio al margen de esta tesis²²⁴, consistentes en reacción a temperatura ambiente con 1.1 equivalentes de agente alquilante, utilizando 2 equivalentes de NaH como base y mezcla (9:1) de THF/DMF como disolvente (Tabla 2.9, entrada 2). En estas condiciones, tras 1 h de reacción, aunque aumentaba significativamente el producto de monobencilación en N_1 **(R)-104c** (32%), el rendimiento de la dibencilación en N_1 y en el grupo guanidino **(R)-106c** se mantenía del mismo orden (30%). Con el fin de disminuir este rendimiento, se bajó la temperatura. A -20 °C, se observó que la proporción de **(R)-104c** aumentaba, aunque el rendimiento global era muy bajo (16%, entrada 3), mientras que, a 0 °C, se mantenía la proporción **(R)-104c/(R)-106c**, pero el rendimiento global aumentaba hasta el 75%. Tras la primera hora de reacción, la adición de un exceso de 0.5 equivalentes de bromuro de bencilo y uno de NaH dio lugar a un ligero aumento en la proporción de **(R)-104c** (57%) y en el rendimiento global (80 %, entrada 5). Hay que señalar que, cuando se utilizó THF como disolvente (entradas 6 y 7), en lugar de la mezcla THF/DMF, la reacción fue significativamente más lenta y al intentar activarla a la temperatura de reflujo disminuyó la proporción de bencilación en N_1 con respecto a la bencilación en el grupo guanidino [**(R)-105c** + **(R)-106c**]. También se estudió la utilización de las bases de tipo fosfaceno como BTPP. En este caso, a 0 °C, el producto de partida permanecía inalterado, mientras que, al aumentar la temperatura, se obtenían mezclas complejas de productos de reacción difíciles de identificar.

A la vista del conjunto de resultados recogidos en la Tabla 2.9, se decidió que las condiciones óptimas para la bencilación de las 2-oxopiperazinas **100-103** en N_1 eran: reacción a 0°C, utilizando 1.5 eq. de BnBr como agente alquilante y 3 eq. de NaH como base, en mezcla THF/DMF (9:1). El BnBr y el NaH se adicionaron durante 3 horas en tres porciones sucesivas de 0.5 y 1 eq, respectivamente. En estas condiciones, las 2-oxopiperazinas portadoras del grupo bencilo en N_4 , **100c** y **101c**, condujeron a los N_1, N_4 -

dibencilados **104c** y **107c**, con rendimientos comprendidos entre el 40 y 52%, y a los tribencilados en N₁, N₄ y en el grupo guanidino **106c** y **109c**, con rendimientos comprendidos entre el 11 y 15% (Esquema 2.24).

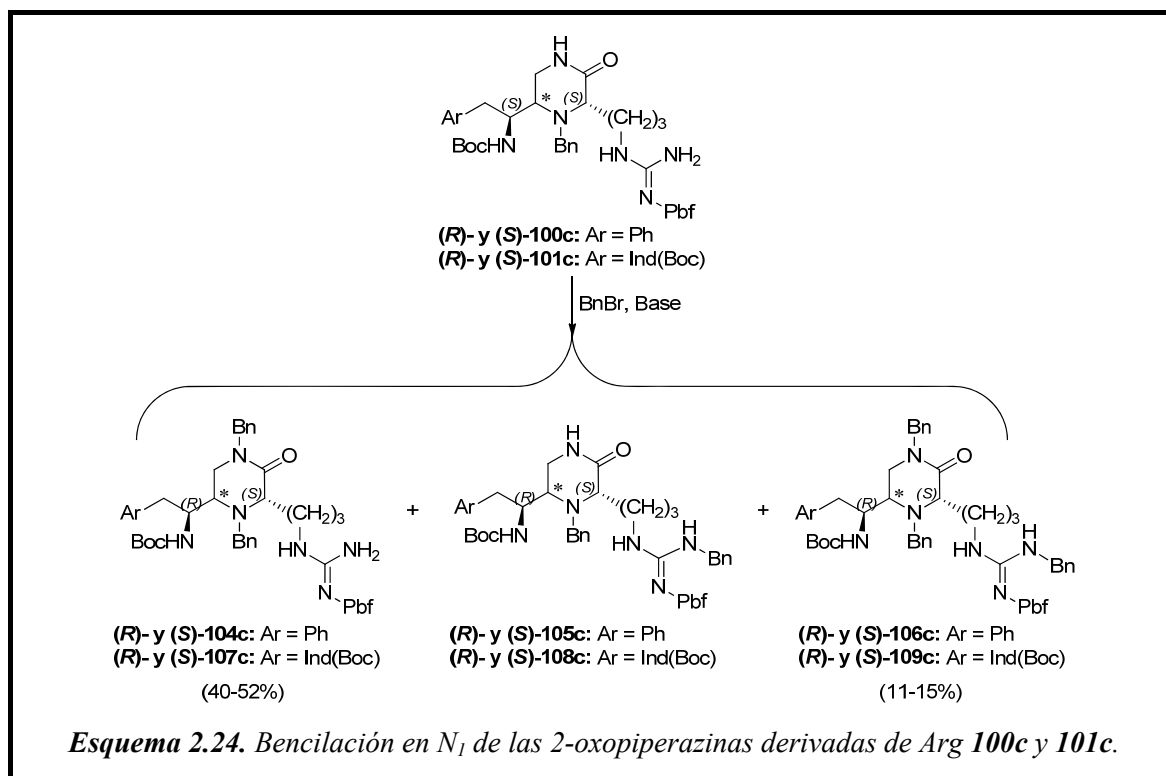


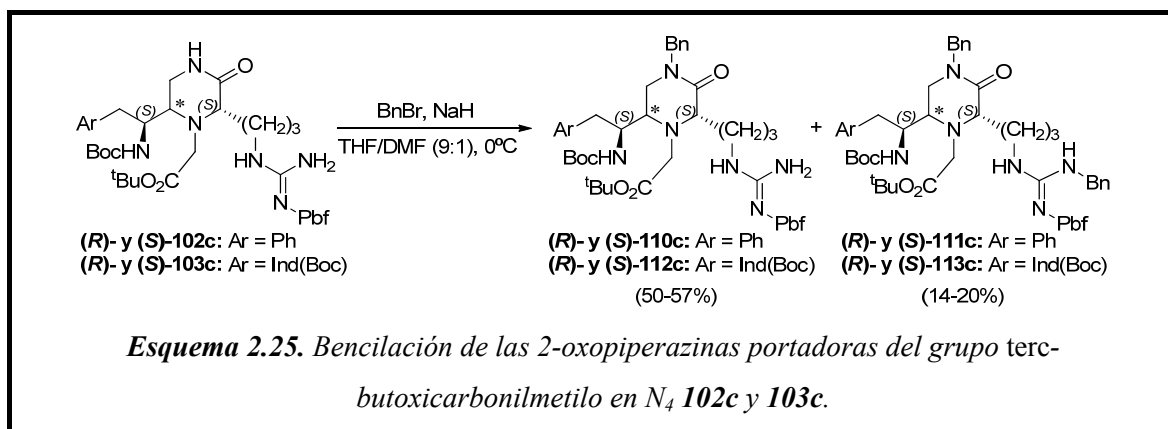
Tabla 2.9. Bencilación de la 2-oxopiperazina (**R**)-**100c** en N₁.

Entrada	Condiciones de Reacción					Rendimientos (%) ^a		
	Disolvente	Base (eq.)	Eq. BnBr	T (°C)	t (h)	(R)-104c	(R)-105c	(R)-106c
1	CH ₃ CN	Cs ₂ CO ₃ (1)	1	150	0.5	5	14	33
2	THF/DMF (9:1)	NaH (2)	1.1	t.a.	1	32	1	30
3	THF/DMF (9:1)	NaH (2)	1.1	-20	1	11	0	5
4	THF/DMF (9:1)	NaH (2)	1.1	0	1	48	2	25
5 ^b	THF/DMF (9:1)	NaH (3)	1.5	0	3	58	2	20
6	THF	NaH (2)	1	t.a.	1	14	5	3
7	THF	NaH (2)	1	66	1	35	16	18

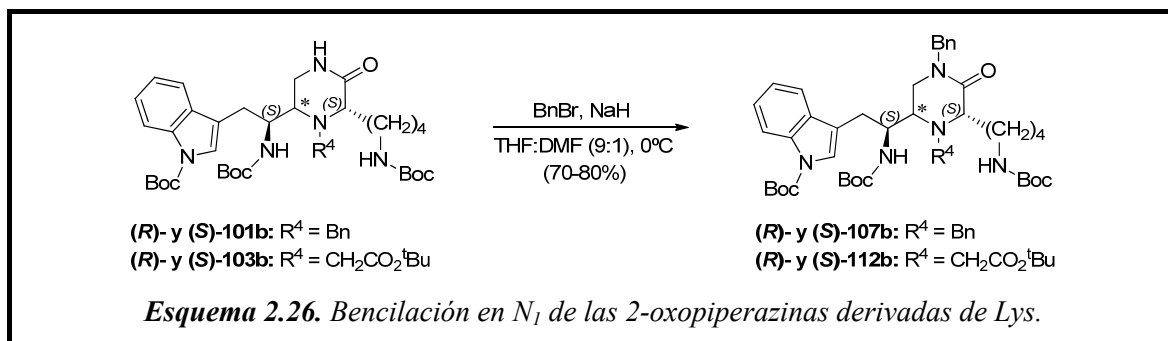
^aCalculados por HPLC [Sunfire C₁₈ (4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 80-100% de A en B en 30 min]. ^bDatos correspondientes a adiciones sucesivas de 1 eq. de NaH y 0.5 eq. de BnBr cada hora.

Hay que señalar que los compuestos bencilados en N₄ y en el grupo guanidino **105c** y **108c**, si bien los análisis por HPLC-MS de los crudos de reacción indicaban que eran compuestos dibencilados, no pudieron ser aislados para su completa caracterización.

Por otra parte, a partir de las 2-oxopiperazinas portadoras del grupo *terc*-butoxicarbonilmetilo en N₄ **102c** y **103c**, aplicando la metodología optimizada, se obtuvieron los correspondientes productos monobencilados en N₁ **110c** y **112c**, con rendimientos comprendidos entre el 50 y 57%, y los dibencilados en posición N₁ y en el grupo guanidino **111c** y **113c**, con rendimientos comprendidos entre el 14 y 20% (Esquema 2.25).

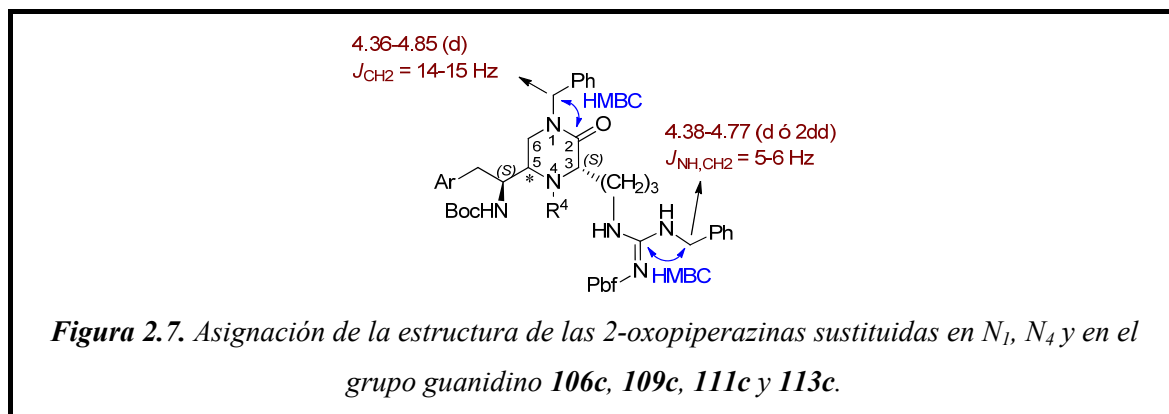


De forma análoga, se prepararon las 2-oxopiperazinas derivadas de triptófano y lisina benciladas en N₁ **107b** y **112b** (Esquema 2.26). En este caso, no se observaron reacciones secundarias de alquilación en el NH-Boc de la cadena de lisina y los productos fueron aislados con altos rendimientos (70-80 %).



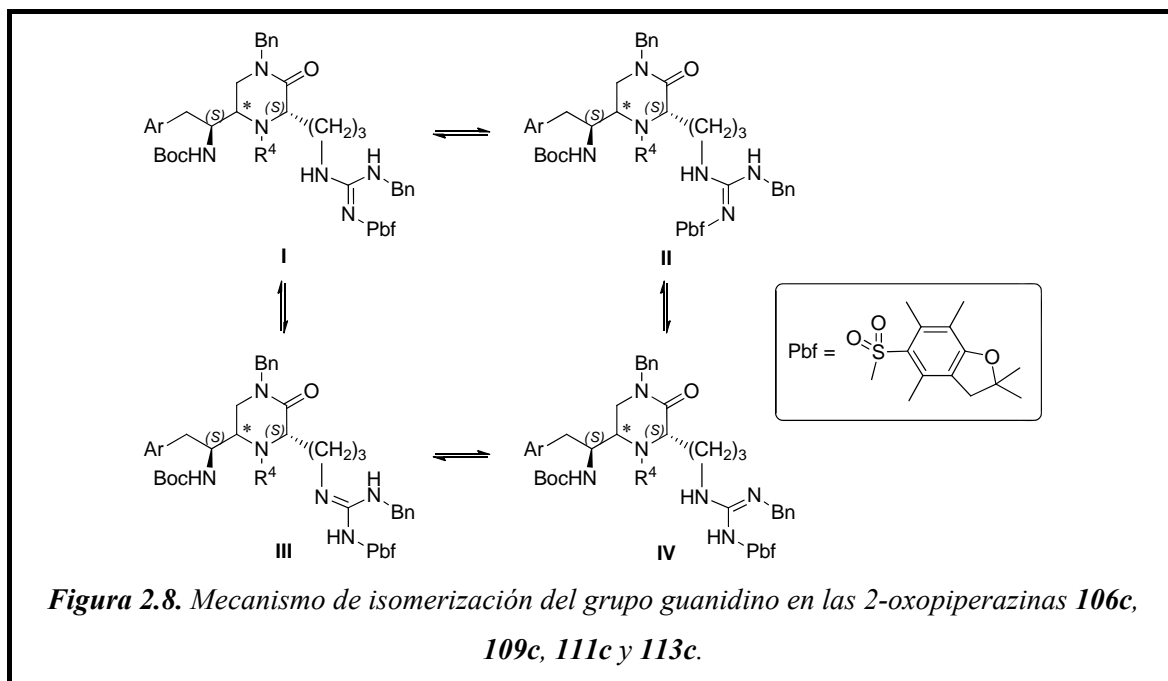
En los espectros de ¹H-RMN de las 2-oxopiperazinas N₁,N₄-disustituidas **104**, **107**, **110** y **112**, en comparación con los de las respectivas 2-oxopiperazinas de partida **100-103**,

se observaba la desaparición del singlete a 6.82-7.21 ppm, correspondiente al N₁-H lactámico, y la aparición de las señales correspondientes al metileno del grupo bencilo entrante, como un sistema AB, a 4.35-4.84 ppm. En los espectros de correlación ¹H, ¹³C HMBC, estas señales correlacionaban con la señal correspondiente al C₂, a 170-171.2 ppm. En las 2-oxopiperazinas benciladas en N₁ y en el grupo guanidino **106c**, **109c**, **111c** y **113c**, el análisis de HPLC-MS indicaba la presencia de dos picos solapados, que no pudieron ser resueltos, correspondientes a dos isómeros en relación variable comprendida entre (2:1) y (5:1), excepto para los epímeros (**R**)-**106c** y (**R**)-**109c**, en los cuales solo se observó la presencia de un solo pico con la masa deseada. A pesar de que la asignación de los espectros de RMN de todos los compuestos fue muy dificultosa debido a problemas de resolución y de solapamiento de señales, en todos los casos, en los espectros de ¹H-RMN en (CD₃)₂CO se observaba la presencia también de dos especies isoméricas en proporción similar a la determinada por HPLC-MS. Estos espectros mostraban la existencia de grupos bencílicos claramente diferenciados en las señales correspondientes a los respectivos grupos metilénicos, cuya asignación fue realizada con la ayuda de espectros de correlación ¹H, ¹H, COSY y ¹H, ¹³C HSQC y HMBC (Figura 2.7).

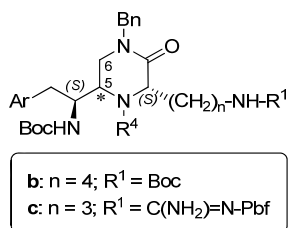


Los protones metilénicos de los grupos bencilo en N₁ del anillo de piperazina y en el grupo guanidino presentaban desplazamientos químicos muy próximos, solapándose en algunos de los casos. Su asignación se realizó en base a las correlaciones observadas en los espectros HMBC entre las señales correspondientes a estos protones metilénicos y el carbono lactámico C₂, a 170-172 ppm, o el carbono del grupo guanidino, a 154-156 ppm, respectivamente. Los protones metilénicos del bencilo en N₁ (1-CH₂) aparecían como un sistema AB para cada uno de los isómeros con constantes de acoplamiento geminal (14-15 Hz). Sin embargo, los protones metilénicos del bencilo en el guanidino, para cada uno de

los isómeros, aparecían como doblete o como dos dobletes de dobletes, acoplados con uno de los NH del grupo guanidino, con constantes de acoplamiento con este NH de 5-6 Hz. Estas señales variaban con la temperatura y, al agitar con D₂O, los dobletes colapsaban a singletes y los dobletes de dobletes a dobletes. Los datos anteriores ayudaron a asignar la estructura del grupo guanidino, fijando el C=N unido al grupo protector Pbf (Figura 2.8, **I** o **II**), como se ha descrito previamente para sulfoguanidinas²³⁰⁻²³². Las dos formas isoméricas que se observan en HPLC y RMN podrían corresponder a los dos isómeros geométricos en el grupo guanidino **I** (*Z*) y **II** (*E*). La isomerización **I** ⇌ **II** se podría producir por inversión en el nitrógeno que soporta el grupo Pbf o por prototropía e interconversión en alguna de las formas tautoméricas **III** o **IV**^{230,233,234}. Esta interconversión podría explicar la baja resolución de los espectros.



En el análisis de los datos de RMN de las 2-oxopiperazinas N₁,N₄-disustituidas **104**, **107**, **110** y **112** (Tabla 2.10), en comparación con los de las respectivas 2-oxopiperazinas de partida N₄-monoalquiladas **100-103**, no se observó una influencia significativa de la introducción del grupo bencilo en N₁ sobre los parámetros de los protones 3- y 5-H.

Tabla 2.10. Comparación de los datos más significativos de RMN de las 2-oxopiperazinas 1,4-disustituídas **104**, **107**, **110** y **112**.

Comp.	Ar	R ⁴	Conf. (*)	5-H ^a	J _{5,6} (Hz)	Conform. Preferente
(<i>R</i>)- 104c	Ph	Bn	(<i>R</i>)	3.48	4 y 12	B
(<i>S</i>)- 104c	Ph	Bn	(<i>S</i>)	3.07	6 y 12	A
(<i>R</i>)- 107b	Ind(Boc)	Bn	(<i>R</i>)	3.59	7 y 12	B
(<i>S</i>)- 107b	Ind(Boc)	Bn	(<i>S</i>)	3.16	5.5 y 11	A
(<i>R</i>)- 107c	Ind(Boc)	Bn	(<i>R</i>)	3.58	4 y 12	B
(<i>S</i>)- 107c	Ind(Boc)	Bn	(<i>S</i>)	3.15	6 y 12	A
(<i>R</i>)- 110c	Ph	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>R</i>)	3.39	4 y 12	B
(<i>S</i>)- 110c	Ph	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>S</i>)	3.22	-	-
(<i>R</i>)- 112b	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>R</i>)	3.46	4 y 12	B
(<i>S</i>)- 112b	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>S</i>)	3.30	-	-
(<i>R</i>)- 112c	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>R</i>)	3.50	4 y 12	B
(<i>S</i>)- 112c	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(<i>S</i>)	3.28	-	-

^aEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC.

Respecto a las constantes de acoplamiento del protón 5-H con los protones 6-H, todos los epímeros (*R*) (sustituyentes en 3 y 5 en disposición relativa *trans*) mostraron constantes de 4-7 y 12 Hz, indicativas de disposición pseudoaxial para 5-H y, por lo tanto, también adoptarían una conformación preferente de tipo bote (Figura 2.6, **B**) como se ha comentado para los respectivos epímeros N₄-monoalquilados. En lo que respecta a los epímeros (*S*), en los derivados N₁,N₄-dibencilados (**S**)-**104c** y (**S**)-**107b,c**, dichas constantes (6 y 12 Hz) también fueron indicativas de una disposición pseudoaxial para 5-H y, por lo

tanto, de una conformación preferente de tipo silla (Figura 2.6, A). Sin embargo, en las 2-oxopiperazinas portadoras del grupo *terc*-butoxicarbonilmetilo en N₄ (**S**)-**110c** y (**S**)-**112b,c**, debido a solapamiento de señales no fue posible medir las constantes de acoplamiento, pero los dos protones 6-H aparecían como equivalentes en los espectros de ¹H RMN, hecho que, como ya se ha comentado, indicaba gran movilidad conformacional. En las 2-oxopiperazinas benciladas en N₁ y en el grupo guanidino **106c**, **109c**, **111c** y **113c**, no fue posible realizar este estudio conformacional dado el solapamiento y los problemas de resolución de los espectros ¹H-RMN, comentados anteriormente.

2.3.5. Síntesis de bencilureas derivadas de 2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de Arg

En las 1,4-dibencil-2-oxopiperazinas derivadas de arginina **104c** y **107c** se abordó la introducción del agrupamiento bencilureido en el amino exocíclico de la posición 5, aplicando la metodología comentada en el capítulo anterior (apartado 2.2.5) para la síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en C₃. Así, tal como se indica en el Esquema 2.28, el tratamiento de ambos epímeros (*R*) y (*S*) de **104c** y **107c** con disolución 3 N de HCl en EtOAc dio lugar a la eliminación, de forma selectiva, del grupo protector Boc, manteniendo inalterado el grupo protector Pbf del grupo guanidino. La posterior reacción con isocianato de bencilo en presencia de TEA condujo a las correspondientes ureas (*R*)- y (*S*)-**114c** y -**115c** con rendimientos del 50-80%. Hay que señalar que, para los derivados de Trp(Boc) (*R*)- y (*S*)-**107c** los rendimientos fueron inferiores a los de los respectivos derivados de Phe (*R*)- y (*S*)-**104c**, debido a que, en el tratamiento con el medio ácido, la protección Boc en el anillo de indol no se había eliminado por completo, dando lugar a mezclas de reacción de ureas más sucias y difíciles de purificar. Se intentó forzar las condiciones de desprotección, elevando la temperatura y utilizando medios ácidos más fuertes pero, en estas condiciones, se eliminaba también el grupo protector Pbf, por lo que no fue posible mejorar los rendimientos.

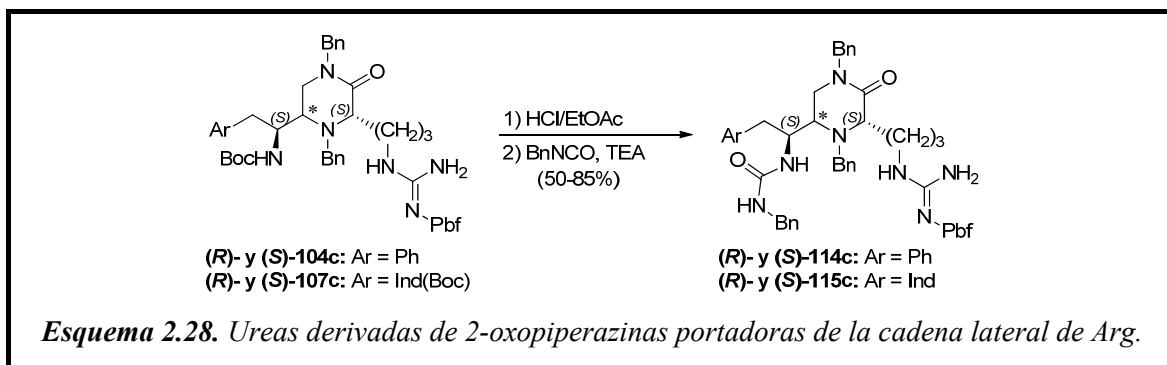
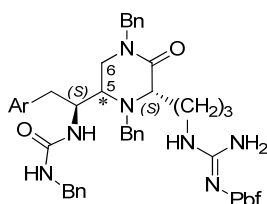


Tabla 2.11. Comparación de los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las bencil ureas derivadas de 2-oxopiperazinas 1,4-benciladas **114c** y **115c**.



Comp.	Ar	Conf. (*)	HPLC t_R (min)	5-H ^c	J _{5,6} (Hz)	Conform. Preferente
(<i>R</i>)- 114c	Ph	(<i>R</i>)	8.12 ^a	3.50	4.5 y 12.5	B
(<i>S</i>)- 114c	Ph	(<i>S</i>)	11.52 ^a	3.10	8	-
(<i>R</i>)- 115c	Ind	(<i>R</i>)	11.23 ^b	3.53	4.5 y 12.5	B
(<i>S</i>)- 115c	Ind	(<i>S</i>)	13.75 ^b	3.12	-	-

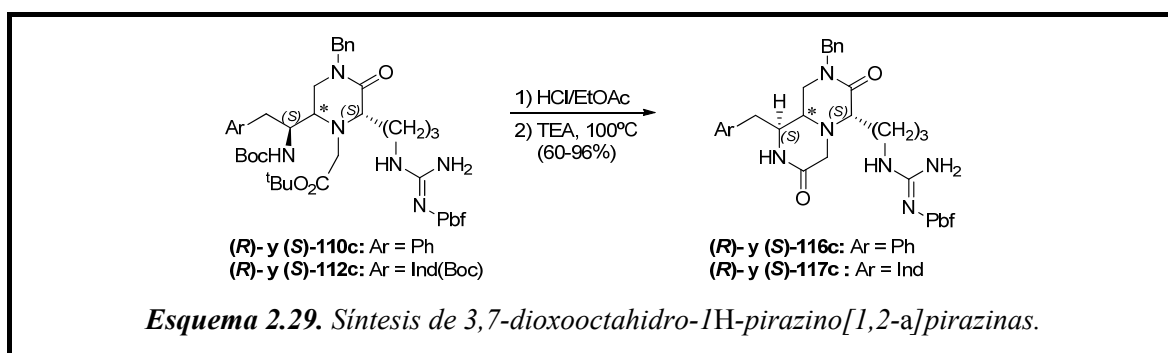
^aHPLC [columna Sunfire C₁₈(4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 50-100% de A en B en 30 min]. ^bHPLC [columna Sunfire C₁₈(4.6 × 150 mm, 3.5 μm), gradiente 60-100% de A en B en 30 min]. ^cEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC.

En la comparación de datos analíticos y espectroscópicos para las parejas de epímeros de las ureas (*R*)- y (*S*)-**114c** y **-115c** (Tabla 2.10), en HPLC se observó que el tiempo de retención de los epímeros (*R*) era menor que para los respectivos epímeros (*S*). En los espectros de RMN no se observó una influencia significativa de la introducción del grupo ureido sobre los desplazamientos químicos de los protones y carbonos del anillo de 2-oxopiperazina. En cuanto a las constantes de acoplamiento de 5-H con los 6-H, al igual que en los compuestos de partida, los epímeros (*R*) mostraron valores indicativos de una disposición pseudoaxial para 5-H y, por lo tanto, adoptarían también una conformación preferente de tipo bote **B**. Sin embargo, en los epímeros (*S*) los protones 6-H aparecían

como equivalentes, indicativos, como ya se ha comentado de alta movilidad conformacional.

2.3.6. Síntesis de 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas

Por último, en las 2-oxopiperazinas derivadas de arginina y portadoras del grupo *tert*-butoxicarbonilmetilo en N₄ (*R*)- y (*S*)-**110c** y -**112c** se estudió su ciclación a derivados de 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas, de forma análoga a como se ha comentado en el Apartado 2.2 para las 2-oxopiperazinas derivadas de Phe-Gly. Así como se muestra en el Esquema 2.29, la eliminación de los grupos protectores Boc de **110c** y **112c**, seguida de calentamiento a 100°C asistido por microondas, en presencia de TEA, condujo a los correspondientes derivados de 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas **116c** y **117c** con rendimientos del 60-96%. Al igual que en la formación de las ureas **114c** y **115c**, los rendimientos obtenidos para los compuestos derivados de 2-oxopiperazinas portadoras del anillo de indol protegido con el grupo Boc **117c** fueron menores.

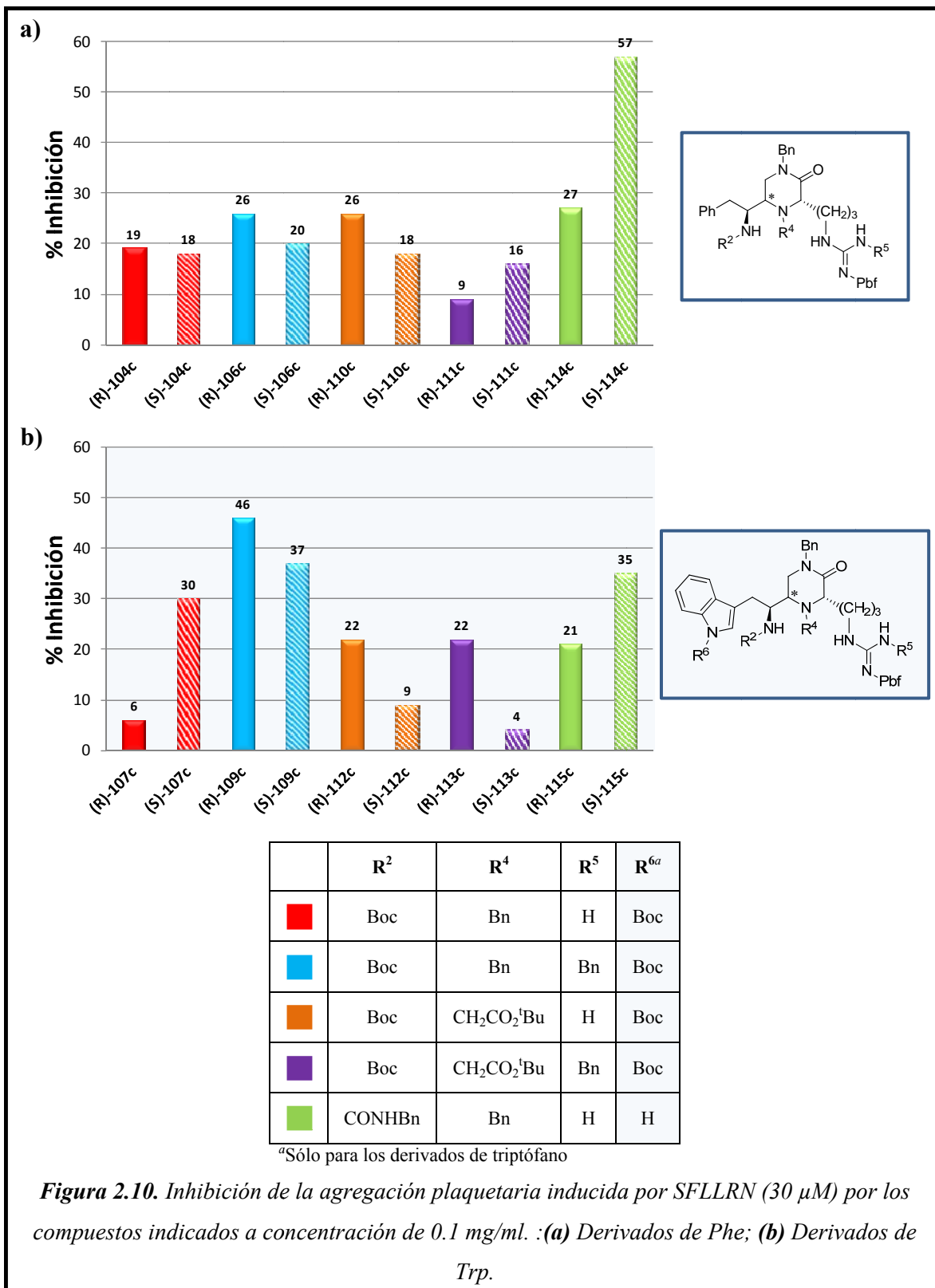


2.3.7. Evaluación biológica

2.3.7.1. Evaluación de la actividad antagonista sobre receptores PAR1

Al igual que los derivados de 2-oxopiperazina de la serie **A**, comentados en el capítulo anterior, todos los compuestos incluidos en este capítulo fueron evaluados como inhibidores de la agregación de plaquetas humanas, inducida por una concentración 30μM del agonista de referencia de los receptores PAR1 SFLLRN, a una concentración inicial de

0.1 mg/ml. En este ensayo, el antagonista de referencia RWJ-58259, a concentración 10 μ M, inhibió un 98% la agregación plaquetaria. En las gráficas de la Figura 2.10 se muestran los resultados más significativos de esta evaluación.



Ninguna de las 2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de lisina **97b**, **101b**, **103b**, **107b** y **112b**, así como los derivados de 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazina **116c** y **117c** inhibieron la agregación plaquetaria. Sin embargo, entre las 2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de arginina, algunos de los derivados bencilados en N₁ mostraron inhibición moderada. Al igual que en el caso de los compuestos de la serie **A**, la pequeña variabilidad en los valores de inhibición de los compuestos activos y su poca correlación con las variaciones estructurales no permitió establecer relaciones estructura-actividad claras. Así, por ejemplo, no se observó una influencia definida de la configuración en C₅ sobre la actividad, posiblemente, debido a la comentada variabilidad conformacional de cada pareja de epímeros dependiendo de los sustituyentes sobre el anillo de piperazina.

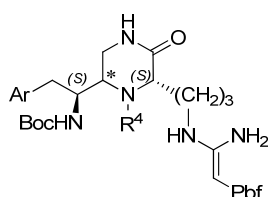
Aunque el compuesto más activo de la serie fue el derivado de fenilalanina (**S**)-**114c**, en general, los derivados de Trp(Boc) mostraron valores de inhibición ligeramente superiores a los de los respectivos análogos derivados de Phe. Asimismo, los valores de inhibición de los derivados 4-bencil sustituidos (en rojo y azul) fueron superiores a los de los respectivos 4-*terc*-butoxicarbonilmetil sustituidos (naranja y morado). La presencia del bencilo en el grupo guanidino no afectó significativamente a la actividad. Por último, la sustitución del grupo exocíclico Boc de (**R**)- y (**S**)-**104c** y **-107c** (en rojo) por el bencilureido en (**R**)- y (**S**)-**114c** y **-115c** (en verde) produjo un aumento significativo en los valores de inhibición, en particular en los derivados de Phe. El menor aumento de la actividad en los derivados de Trp (**R**)- y (**S**)-**115c** podría ser debido a que en estos compuestos la introducción del grupo bencilureido va unida a la eliminación del grupo Boc en el indol del triptófano.

En la comparación del mejor compuesto de la serie, la urea (**S**)-**114c** (I = 57%), con la mezcla epimérica de ureas análogas de la serie **A**, derivadas de Phe-Gly, (**RS**)-**97c** (I = 38%, apartado 2.2.7.1), las diferencias no son significativas, ya que, en este caso, el valor de inhibición es el promedio de los dos epímeros [(*R*):(*S*) = 3:1], que no tienen porqué ser idénticos. Esta comparación parece indicar que la localización de la cadena lateral del aminoácido básico tampoco influye significativamente sobre la actividad.

2.3.7.2. Evaluación como agentes antitumorales

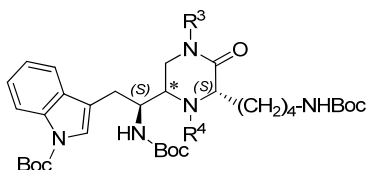
Todos los derivados de 2-oxopiperazinas **96-115**, así como las 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazina **116c** y **117c** fueron incluidos en los ensayos de actividad citotóxica en líneas celulares de carcinoma humano de mama(MDA-MB-231), pulmón (A549) y colón (HT29). Las 2-oxopiperazinas derivadas de Arg benciladas en N₁ **104c-115c**, así como las 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazina **116c** y **117c** no mostraron citotoxicidad a concentraciones inferiores a 10⁻⁵ M. Sin embargo, como se recoge en las Tablas 2.12 y 2.13, tanto las 2-oxopiperazinas derivadas de Arg no sustituidas en N₁ **100c**, **101c** y **103c** (Tabla 2.12), como la mayoría de los derivados de lisina (Tabla 2.13) mostraron citotoxicidad moderada de orden micromolar. Al igual que los valores de inhibición de la agregación plaquetaria, los valores de citotoxicidad tampoco permitieron establecer relaciones estructura-citotoxicidad claras.

Tabla 2.12. Citotoxicidades más significativas de las 2-oxopiperazinas derivadas de arginina.



Compuesto	Ar	R ⁴	Conf. (*)	GI ₅₀ (μM)		
				Mama (MDA-MB-231)	Pulmón (A549)	Colon (HT29)
Doxorrubicina		-	-	10 ⁻¹ -10 ⁻²	10 ⁻¹ -10 ⁻²	10 ⁻¹ -10 ⁻²
RWJ-58259		-	-	>12.1	>12.1	>12.1
(R)-100c	Ph	Bn	(R)	6.83	1.24	5.26
(S)-100c	Ph	Bn	(S)	6.04	5.39	3.29
(R)-101c	Ind(Boc)	Bn	(R)	4.44	4.89	3.78
(S)-101c	Ind(Boc)	Bn	(S)	4.55	5.55	3.78
(R)-103c	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(R)	4.54	3.25	4.98
(S)-103c	Ind(Boc)	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(S)	4.87	7.68	2.92

Tabla 2.13. Citotoxicidades más significativas de las 2-oxopiperazinas derivadas de lisina.



Compuesto	R ³	R ⁴	Conf. (*)	GI ₅₀ (μM)		
				Mama (MDA-MB-231)	Pulmón (A549)	Colon (HT29)
Doxorrubicina	-	-	-	10 ⁻¹ -10 ⁻²	10 ⁻¹ -10 ⁻²	10 ⁻¹ -10 ⁻²
RWJ-58259	-	-	-	>12.1	>12.1	>12.1
(R)-97b	H	H	(R)	5.56	> 10	5.43
(S)-97b	H	H	(S)	5.31	9.75	5.43
(R)-101b	H	Bn	(R)	2.92	4.86	4.58
(S)-101b	H	Bn	(S)	4.58	5.56	4.45
(R)-103b	H	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(R)	2.29	4.57	3.09
(S)-103b	H	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(S)	6.72	8.60	5.78
(R)-108b	Bn	Bn	(R)	3.33	> 10	> 10
(S)-108b	Bn	Bn	(S)	1.48	> 10	3.83
(R)-112b	Bn	CH ₂ CO ₂ ^t Bu	(R)	1.56	> 10	4.44

2.3.8. Conclusiones

Del conjunto de resultados comentados en este capítulo, se puede concluir:

- Con el objetivo de obtener nuevos antagonistas de los receptores de trombina PAR1, se ha puesto a punto una metodología eficaz para la síntesis de derivados de 2-oxopiperazinas 1,3,4,5-tetrasustituidas a partir de pseudodipéptidos cianometilenamino derivados de aminoácidos aromáticos y básicos. Esta metodología implica como etapas clave: a) reducción, mediante hidrogenación catalítica de los pseudodipéptidos de partida; b) alquilaciones regioselectivas secuenciales en las posiciones N₄ y N₁ y c) eliminación selectiva de los grupos protectores Boc que aporta el aminoácido aromático, seguida de reacción con isocianato de bencilo, para introducir de forma

regioselectiva el grupo bencilureido.

- En el anillo de 2-oxopiperazina, la alquilación de la posición N₄ es preferente con respecto a la posición N₁, de tipo lactámico. La utilización de distintas bases y distintos disolventes permite la alquilación de ambas posiciones de forma regioselectiva. En los compuestos derivados de arginina, la alquilación en el grupo guanidino, a pesar de estar protegido con el grupo Pbf, compete con la alquilación en N₁. Tras el correspondiente estudio de optimización de condiciones de alquilación, se ha conseguido una regioselectividad de (3:1) a favor de la alquilación en N₁, con respecto a la dialquilación en N₁ y en el grupo guanidino.
- Los datos de ¹H-RMN indican una alta variabilidad conformacional en el anillo de 2-oxopiperazina dependiendo de la configuración relativa de las posiciones C₃ y C₅, así como de los sustituyentes en las posiciones N₁ y N₄.
- En los derivados de 2-oxopiperazina portadores del grupo *tert*-butoxicarbonilmetilo en posición N₄, la eliminación de la protección Boc, seguida de tratamiento con medio básico, permite la obtención de los correspondientes derivados de 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2,*a*]pirazinas 1,6,8-trisustituidas.
- La mayoría de las 1-bencil-2-oxopiperazinas derivadas de arginina han mostrado moderada actividad antagonista de PAR1 en el ensayo de inhibición de la agregación plaquetaria inducida por el agonista SFLLRN. El poco rango de variabilidad en los valores de inhibición y la falta de correlación con las variaciones estructurales no han permitido establecer relaciones claras estructura-actividad.
- La mayoría de las 2-oxopiperazinas derivadas de Lys(Boc), así como los derivados de Arg(Pbf) no sustituidos en N₁, han mostrado citotoxicidad de orden micromolar en líneas celulares de carcinoma humano de mama, pulmón y colón.

3. CONCLUSIONES GENERALES

- A partir de recientes estudios estructurales sobre la interacción de trombina con su receptor PAR1, dentro de un amplio programa de búsqueda de agentes antiangiogénicos innovadores, hemos propuesto una hipótesis general para el diseño de potenciales antagonistas de los receptores PAR1. Esta hipótesis se ha definido como una estructura general constituida por un esqueleto central portador de, al menos, tres puntos de diversidad molecular para el anclaje de los grupos definidos como farmacofóricos para la interacción de alta afinidad entre trombina y PAR1. Dichos grupos son uno o dos grupos aromáticos y uno o dos grupos de carácter básico, anclados a distancias y con orientación diversa.
- Para explorar la validez de la hipótesis, se han sintetizado dos series de 2-oxopiperazinas derivadas de aminoácidos aromáticos y básicos con diverso grado de sustitución en las posiciones 1, 3, 4 y 5.
- La evaluación biológica de los compuestos sintetizados como potenciales antagonistas de receptores PAR1 ha requerido la previa preparación del antagonista de referencia RWJ-58259. Con el fin de obtener la cantidad necesaria de este antagonista a un coste razonable y asequible para el grupo de investigación, ha sido necesario realizar un estudio de optimización del proceso de síntesis descrito. La optimización de 4 etapas de esta síntesis ha permitido aumentar 29 veces el rendimiento global de RWJ-58259, con respecto a la metodología previamente descrita.
- Para la síntesis de las 2-oxopiperazinas propuestas, se ha aplicado una estrategia de síntesis orientada a la diversidad, utilizando pseudodipéptidos cianometilnamino derivados de α -aminoácidos aromáticos y básicos como intermedios de síntesis comunes y aplicando esquemas de síntesis con etapas de ramificación de la diversidad.
- Se ha prestado especial atención a la regioselectividad y estereoselectividad de los

esquemas sintéticos y, en su caso, a la resolución de diastereoisómeros. En este sentido, se ha estudiado la introducción regioselectiva de sustituyentes en las posiciones N₄ y N₁ del anillo de 2-oxopiperazina mediante reacciones de alquilación. En estas reacciones la base y el disolvente utilizados son críticos para la regioselectividad. Estos estudios han puesto también de manifiesto la participación del grupo guanidino de la cadena lateral de los derivados de arginina en las reacciones de alquilación, a pesar de estar protegido con el grupo Pbf. Esta participación limita, en gran medida, las condiciones para la alquilación regioselectiva en la posición N₁ del anillo de 2-oxopiperazina.

- La eliminación del grupo protector Boc en 5-(*terc*-butoxicarbonilamino)metil-4-(*terc*-butoxicarbonil)metil-2-oxopiperazinas da lugar a la formación de los respectivos biciclos 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2,*a*]pirazinas.
- Los derivados de 2-oxopiperazina sintetizados presentan alta variabilidad conformacional en el anillo de 2-oxopiperazina, dependiendo de la configuración relativa de las posiciones C₃ y C₅, así como de los sustituyentes en las posiciones N₁ y N₄.
- La mayoría de los derivados de 1-bencil-2-oxopiperazina protegidos en la cadena lateral del aminoácido básico han mostrado moderada actividad antagonista de los receptores PAR1, aunque con baja potencia. La falta correlación clara entre los valores de inhibición de la agregación plaquetaria y las variaciones estructurales no nos ha permitido establecer relaciones estructura-actividad.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. PRODUCTOS DE PARTIDA COMERCIALES

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno	FLUKA
1-Hidroxibenzotriazol	IRIS
2- <i>terc</i> -Butilimino-2-etilamino-1,3-perhidro-1,2,3-diazafosforina	FLUKA
4-Dimetilaminopiridina	ALDRICH
4-Nitrofenilcloroformiato	ALDRICH
6-Nitroindol	ABCR
Ácido acético glacial	SCHARLAU
Ácido clorhídrico	NORMAPUR
Ácido fórmico	SCHARLAU
Ácido trifluoroacético	ALDRICH
Bencilamina	ALDRICH
Bencilisocianato	ALDRICH
Bromuro de 2,6-diclorobencilo	FLUKA
Carbonato de <i>bis</i> -triclorometilo (trifosgeno)	ALDRICH
Celita 545	SDS
Cianuro de trimetilsililo	ALDRICH
Cloroformiato de bencilo	ALDRICH
Cs ₂ CO ₃	FLUKA
Diciclohexilcarbodiimida	ALDRICH
Dietilamina	ALDRICH
Diisopropilcarbodiimida	FLUKA
Diisopropiletilamina	FLUKA

Dimetilhidrazina	ALDRICH
FeCl ₃ ·6H ₂ O	FLUKA
Fenilisocianato	ALDRICH
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	BACHEM
H-Arg(Pbf)-OMe	BACHEM
Boc-Lys(Z)-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Lys(Boc)-OH	BACHEM
H-Lys(Boc)-OMe	IRIS
Boc-Orn(Z)-OH	BACHEM
Fmoc-Orn(Boc)-OH	BACHEM
H-Gly-OMe	NOVABIOCHEM
Hidrato de hidrazina	ALDRICH
Hidrocloreto de <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> -metilamina	ALDRICH
H-Phe(Boc)-OH	NOVABIOCHEM
KOH	PANREAC
LiAlH ₄	ALDRICH
Na ₂ CO ₃	PANREAC
Na ₂ SO ₄	QEMICAL
NaBH ₄	ALDRICH
NaCl	PANREAC
NaHCO ₃	PANREAC
NaNO ₂	PANREAC
NaOH	PANREAC
Ni Raney	ALDRICH
N _α -Fmoc-3,4-difluorofenilalanina [Fmoc-3,4-diF-Phe]	IRIS
N _α -Fmoc-N _δ -Boc-γ-n-diaminobutírico [Fmoc-Dab(Boc)-OH]	IRIS
Óxido de propileno	FLUKA
Pd (C) 10%	FLUKA
Piromcarbonato de di(<i>terc</i> -butilo)	ALDRICH
Pirrolidina	FLUKA
<i>terc</i> -Butilimino-tri(dimetilamino)fosforano	FLUKA
<i>terc</i> -Butilimino-tri(pirrolidino)fosforano	FLUKA
Triacetoxiborohidruro sódico	ALDRICH

Trietilamina	SCHARLAU
Triisopropilsilano	ALDRICH
Cloruro de cinc	ALDRICH

Todos los disolventes empleados fueron comerciales y se secaron y purificaron utilizando métodos estándar.

4.2. MÉTODOS GENERALES

Las cromatografías analíticas en capa fina fueron realizadas sobre cromatofolios de 0.2 mm de espesor, con gel de sílice de tipo 60, Merck F₂₅₄. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o a 365 nm y mediante pulverización con disolución al 2% de ninhidrina en EtOH y posterior calefacción.

Las separaciones cromatográficas en columna de media presión (flash) se realizaron con gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh) y empleando cartuchos SNAP de Sílice KP-SIL de 5g (12 x 75 mm), 10g (12 x 150 mm) o 50g (39 x 81 mm) y KP-C18-HS 12g (12 x 150 mm), utilizando un equipo Biotage Isolera One. Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen.

Las purificaciones realizadas mediante cromatografía radial, fueron llevadas a cabo en un cromatotrón Harrison Research modelo 8924, en placas circulares de vidrio, sobre las que se utilizó gel de sílice 60 PF₂₅₄ con yeso, en capas de 1 ó 2 mm de espesor.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Mettler Toledo M170.

Los análisis elementales se realizaron en un analizador Heareus CHN-O-RAPID y se consideran satisfactorios los valores comprendidos en el rango ± 0.4 % respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares.

Los espectros de ¹H-RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300 (300 MHz), Bruker-AVANCE 300 (300 MHz), Varian-INOVA 400 (400 MHz), Varian-Mercury 400 (400MHz) o Varian Unity 500 (500 MHz). En las muestras disueltas en CDCl₃ se utilizó TMS como referencia interna, y en el resto se empleó la señal correspondiente al disolvente utilizado (acetona-d₆, DMSO-d₆, D₂O). En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación

de las diferentes señales de ^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear ^1H , ^1H COSY y heteronuclear ^1H , ^{13}C HSQC. Los experimentos 1D NOESY se registraron a 400 MHz utilizando 2 s de tiempo de espera y 500 ms de tiempo de mezcla.

Los espectros de ^{13}C -RMN se registraron en espectrómetros Varian-INOVA 300 (75 MHz), Bruker-AVANCE 300 (75 MHz), Varian-INOVA 400 (100 MHz), Varian-Mercury 400 (100 MHz) o Varian Unity 500 (125 MHz), utilizando las mismas referencias internas que en los espectros de ^1H RMN. Las asignaciones de las diferentes señales de ^{13}C -RMN se realizaron mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H , ^{13}C de tipo HSQC y HMBC.

Los análisis HPLC analíticos se llevaron a cabo en un equipo Waters 600, equipado con una columna de fase reversa Sunfire C_{18} (4.6×150 mm, $3.5 \mu\text{m}$) o Novapack C_{18} (3.9×150 mm, $4 \mu\text{m}$). El flujo utilizado fue de 1 ml/min y se empleó un detector de UV de longitud de onda variable, detectando a 214 y 254 nm. Como eluyente, se utilizaron distintos gradientes de CH_3CN (disolvente A) y disolución al 0.05% de TFA en agua (disolvente B).

Los análisis HPLC-MS se llevaron a cabo en un equipo Waters 12695, equipado con columnas de fase reversa, conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ, utilizando diferentes gradientes que serán indicados en cada caso. Las columnas utilizadas fueron Sunfire C_{18} (4.6×50 mm, $3.5 \mu\text{m}$) y Xbridge C_{18} (4.2×100 mm, $3.5 \mu\text{m}$). El flujo utilizado fue de 1 ml/min y como eluyentes, se utilizaron diferentes gradientes de disolución al 0.1% de HCOOH en CH_3CN (disolvente A) y disolución al 0.1% de HCOOH en agua (disolvente B).

Las Espectrometrías de Masas de Electro spray (ESI-MS) fueron realizada en un aparato Hewlett Packard 1100 MSD, en modo positivo y/o negativo, utilizando como portador MeOH o bien mezcla $\text{MeOH-CH}_3\text{CN-HCOOH}$ (1%). El flujo utilizado fue 0.5 ml/min, presión de nebulizador 40 psi, y la temperatura y flujo de gas de secado fue de 300°C y 10 l/min. En esta técnica los picos $[\text{M}+1]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}-1]^+$ suelen ser las señales más abundantes.

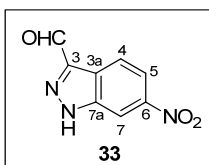
Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141.

Los experimentos de irradiación de microondas fueron realizados en un reactor de microondas monomodo EmrysTM Synthesizer (Biotage AB).

Los productos finales obtenidos fueron liofilizados en un equipo Telstar 6-80.

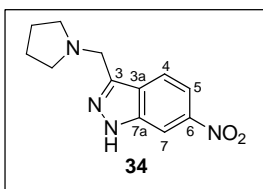
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL ANTAGONISTA DE REFERENCIA RWJ-58259

4.3.1. Síntesis de 6-nitro-1*H*-indazol-3-carbaldehído (**33**)^{152,212}



Sobre una disolución de nitrito sódico (4.30 g, 65 mmol) en agua (120 ml) añadió 6-nitroindol (1.00 g, 6.5 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se acidificó lentamente hasta pH 1 por adición de ácido clorhídrico 6 N y la mezcla resultante se agitó durante 2 h bajo protección de la luz. Pasado este tiempo, la reacción se neutralizó con NaHCO₃ y el producto se extrajo con EtOAc (3×120 ml). Los extractos orgánicos se juntaron y se lavaron con H₂O (50 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y la disolución se evaporó a presión reducida, obteniéndose el producto **22** como un sólido amarillento (990 mg; 84%). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.16 (dd, 1H, *J* = 2 y 9 Hz, 4-H), 8.33 (d, 1H, *J* = 9 Hz, 5-H), 8.59 (d, 1H, *J* = 2 Hz, 7-H), 10.24 (s, 1H, CHO).

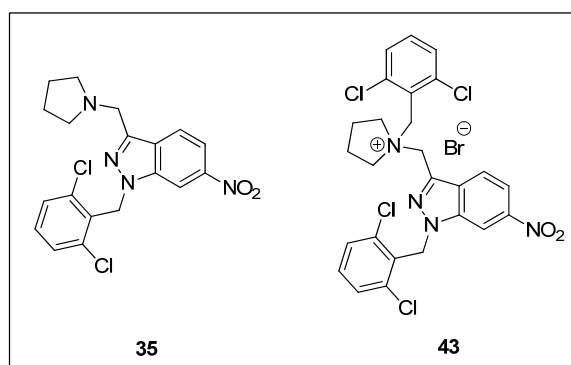
4.3.2. Síntesis de 6-nitro-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1*H*-indazol (**34**)^{152,212}



Sobre una disolución de 6-nitro-1*H*-indazol-3-carbaldehído (**33**) (990 mg, 5.18 mmol) en mezcla CH₂Cl₂/DMF/AcOH (90:9:1) (100 ml), se añadió pirrolidina (2.16 ml, 25.9 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 25 min. A continuación, se adicionó triacetoxiborohidruro sódico (2.75 g, 12.95 mmol) y se agitó durante 1h. Pasado este tiempo, la reacción se diluyó con EtOAc (450 ml), se lavó sucesivamente con una disolución saturada de NaHCO₃ (70 ml) y disolución saturada de NaCl (70 ml), se secó

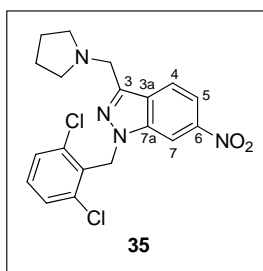
sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente a sequedad, para obtener el producto **34** como un sólido marrón (1.03 g; 81%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.75, 2.58 (2s, 8H, pirrolidina), 4.04 (s, 2H, CH₂-pirrolidina), 7.91 (s, 2H, 4-H y 5-H), 8.31 (s, 1H, 7-H).

4.3.3. *N*-alquilación del indazol **34**. Síntesis de 1-(2,6-diclorobencil)-6-nitro-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1*H*-indazol (**35**) y bromuro de 1-(2,6-diclorobencil)-3-[1-(2,6-diclorobencil)-pirrolidin-1-il]metil-6-nitro-1*H*-indazol (**43**)

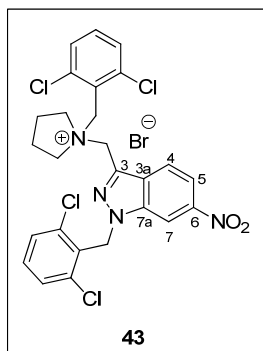


4.3.3.1. Procedimiento descrito^{152,212}

A una disolución del indazol **34**, (1.03 g, 4.20 mmol) en THF (80 ml) se añadió, bajo atmósfera de argón, bromuro de 2,6-diclorobencilo (1.00 g, 4.20 mmol) y a continuación KOH (276 mg, 4.20 mmol) en tres porciones a lo largo de 20 min. Después de 24 h de reacción, la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida. El residuo obtenido se trató con EtOAc (200 ml) y H₂O (40 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con H₂O (2×50 ml) y disolución saturada de NaCl (3×40 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo así obtenido se purificó por cromatografía flash, usando como eluyente gradiente del 0-5% de MeOH en CH₂Cl₂, para obtener el producto deseado **35** como un sólido marrón (579 mg; 34%) y el producto dialquilado **43** como un sólido marrón claro (487 mg, 21%).



1-(2,6-diclorobencil)-6-nitro-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1H-indazol (35). Pf: 138-140°C (hexano); **HPLC-MS** [Xbridge C₁₈, gradiente 20-100% de A en B, 15 min]: $t_R = 9.50$ min; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.70, 2.52 (2s, 8H, pirrolidina), 3.94 (s, 2H, CH₂-pirrolidina), 5.79 (s, 2H, CH₂-diClPh), 7.24 (m, 3H, diClPh), 7.90 [s, 2H, 4-H y 5-H (indazol)], 8.25 [s, 1H, 7-H (indazol)]; **ESI-MS**, m/z : 405.2 (100%) [M+1]⁺.



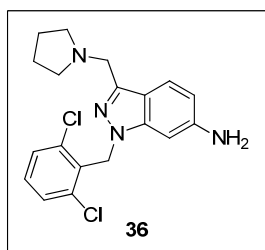
Bromuro de 1-(2,6-diclorobencil)-3-[1-(2,6-diclorobencil)-pirrolidin-1-il]metil-6-nitro-1H-indazol (43). Pf: 210 °C descompone (diclorometano); **HPLC-MS** [Xbridge C₁₈, gradiente 20-100% de A en B, 15 min]: $t_R = 14.16$ min; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1.96, 2.14, 3.14, 3.71 (4m, 8H, pirrolidina), 4.86 (s, 2H, CH₂-pirrolidina), 5.20 (s, 2H, pirrolidina-CH₂-diClPh), 6.12 (s, 2H, CH₂-diClPh), 7.42-7.59 (m, 6H, diClPh), 8.17 [dd, 1H, $J = 1.5$ y 9 Hz, 5-H (indazol)], 8.41 [d, 1H, $J = 9$ Hz, 4-H (indazol)], 9.12 [d, 1H, $J = 1.5$ Hz, 7-H (indazol)]; **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 20.2 [C₃ y C₄ (pirrolidina)], 48.8 [CH₂-diClPh], 54.1 [pirrolidina-CH₂-diClPh], 56.7 [CH₂-pirrolidina], 59.4 [C₂ y C₅ (pirrolidina)], 108.7 [C₇ (indazol)], 117.5 [C₅ (indazol)], 122.1 [C₄ (indazol)], 127.5 [C_{3a} (indazol)], 139.0 [C₃ (indazol)], 140.1 [C_{7a} (indazol)], 140.4 [C₁ (diClPh)], 147.4 [C₆ (indazol)]; **ESI-MS**, m/z : 566.4 (100%) [M-Br]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₂₆H₂₃BrCl₄N₄O₂ (%): C: 48.40, H: 3.59, N: 8.68. Encontrado (%): C: 48.60, H: 3.42, N: 8.75;

4.3.3.2. Procedimiento optimizado

A una disolución del indazol **34**, (1.03 g, 4.20 mmol) en THF (80 ml) se añadió, bajo atmósfera de argón, bromuro de 2,6-diclorobencilo (1 g, 4.20 mmol) y a continuación Cs₂CO₃ (1.37 g, 4.20 mmol) en tres porciones a lo largo de 20 min. Después de 24 h de reacción, la mezcla de reacción se evaporó bajo presión reducida. El residuo obtenido se trató con EtOAc (200 ml) y H₂O (40 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con H₂O (2×50 ml) y disolución saturada de NaCl (3×40 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se centrifugó con éter etílico (3×10 ml) a 8000 rpm, recogiendo el producto en las fracciones etéreas, las cuales se evaporaron a

presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash, usando como eluyente gradiente del 0-5% de MeOH en CH₂Cl₂, para obtener el producto deseado **35** como un sólido marrón (1.38 g; 66%), y el producto dialquilado **43** como un sólido marrón claro (165 mg, 7%).

4.3.4. Reducción del nitroindazol **35**. Síntesis de 6-amino-1-(2,6-diclorobencil)-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1*H*-indazol (**36**)



4.3.4.1. Procedimiento descrito^{152,212}

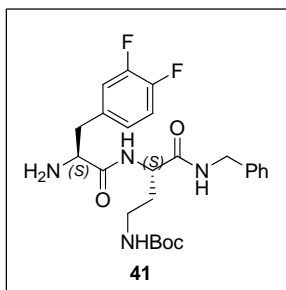
A una disolución del nitroindazol **35** (1.38 g, 3.40 mmol) en MeOH (120 ml) se añadió FeCl₃·6H₂O (173 mg, 0.82 mmol) y carbón activo (1.00 g), seguida de adición de dimetilhidrazina (5.2 ml, 68 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h, pasado este tiempo, se dejó alcanzar temperatura ambiente y el crudo de reacción se filtró a través de celita, lavándose ésta con CH₂Cl₂:MeOH (4:1, 3×30 ml). Los filtrados se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 1-8% de MeOH en CH₂Cl₂ con 2% de NH₄OH, obteniéndose el 6-aminoindazol **36** como un sólido marrón amorfo (760 mg; 60%). **HPLC-MS** [Xbridge C₁₈, gradiente 5-80% de A en B, 15 min]: *t*_R = 10.06 min; **ESI-MS**, *m/z*: 376.3 (100%) [M+1]⁺.

4.3.4.2. Procedimiento optimizado

A una disolución del nitroindazol **35** (1.38 g, 3.40 mmol) en MeOH (120 ml) se añadió el oxihidróxido de hierro (III) Fe_xO_y, sintetizado por precipitación de FeCl₃·6H₂O en disolución de NaOH en agua, según el procedimiento descrito por Lauwiner *et al*²¹⁵, previamente activado en una mezcla agua-metanol durante 30 min, seguido de la adición de hidrato de hidrazina (1.7 ml, 34.0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h, pasado este tiempo, se dejó alcanzar temperatura ambiente y el crudo de reacción se filtró a través de celita, lavándose ésta con MeOH (3×30 ml). Los filtrados se

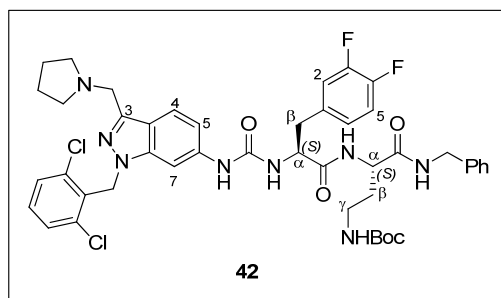
evaporaron a presión reducida, obteniéndose el 6-aminoindazol **36** como un sólido marrón amorfo (1.24 g; 97%).

4.3.5. Síntesis del dipéptido 3,4-di(F)-Phe-Dab(Boc)-NHBn (**41**)^{152,212}



A una disolución de Fmoc-Dab(Boc)-OH (**37**) (400 mg, 0.92 mmol) en CH₃CN anhidro (12 ml), bajo atmósfera de argón, se añadió sucesivamente HOBt (123 mg, 0.92 mmol), bencilamina (100 μ l, 0.92 mmol) y DCC (375 mg, 1.84 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, apareciendo un sólido blanco, el cual se filtró y se lavó con CH₃CN frío (10 ml), obteniéndose la bencilamida Fmoc-Dab(Boc)-NHBn (**38**) en forma de sólido blanco (473 mg; 97%). A continuación, esta amida (473 mg, 0.89 mmol) se adicionó sobre una disolución de dietilamina (924 μ l, 8.90 mmol) en CH₃CN (12 ml) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 2 h. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se agitó vigorosamente con hexano (3 \times 5 ml), obteniéndose por precipitación la bencilamida *N* $_{\alpha}$ -desprotegida H-Dab(Boc)-NHBn (**39**) en forma de sólido blanco (234 mg; 85%). Seguidamente, a una disolución de **39** (234 mg, 0.76 mmol) en CH₃CN anhidro (20 ml) se añadió sucesivamente HOBt (103 mg, 0.76 mmol), Fmoc-3,4-di(F)-Phe-OH (**40**) (322 mg, 0.76 mmol) y DIC (237 μ l, 1.52 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, se enfrió en un baño de hielo y el precipitado se filtró y se lavó con CH₃CN frío (10 ml), obteniéndose el producto Fmoc-3,4-di(F)-Phe-Dab(Boc)-NHBn como un sólido blanco (400 mg, 74%). Finalmente, este sólido (0.56 mmol) se adicionó sobre una disolución de dietilamina (1.16 ml, 11.2 mmol) en CH₃CN (12 ml) durante 3h. A continuación, la mezcla de reacción se filtró y la disolución se evaporó a presión reducida. El residuo se agitó vigorosamente con hexano (3 \times 5 ml), obteniéndose por precipitación el dipéptido 3,4-di(F)-Phe-Dab(Boc)-NHBn (**41**) en forma de sólido blanco amorfo (270 mg; 98%). **HPLC-MS** [Xbridge C₁₈, gradiente 5-80% de A en B, 15 min]: t_R = 11.77 min; **ESI-MS**, m/z : 491.6 (100%) [M+1]⁺.

4.3.6. Síntesis de la urea **42**



4.3.6.1. Procedimiento descrito^{152,212}

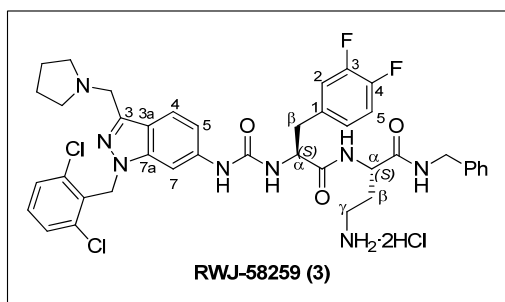
A una disolución del 6-aminoindazol **36** (188 mg, 0.5 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (20 ml), a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y bajo atmósfera de argón, se añadió sucesivamente DIEA (436 μl , 2.5 mmol) y cloroformato de 4-nitrofenilo (113 mg, 0.5 mmol). Después de 30 min de agitación, se añadió el dipéptido **41** (250 mg, 0.5 mmol), agitando 30 min a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y 12 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y el precipitado formado fue filtrado y lavado con CH_2Cl_2 frío, para dar la urea **42** como sólido amarillo amorfo (62 mg, 13.8%). **HPLC-MS** [Xbridge C_{18} , gradiente 5-80% de A en B, 15 min]: $t_R = 14.04$ min; **^1H -RMN** (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 1.34 (s, 9H, Boc), 1.79 [m, 6H, 4H (pirrolidina) y β -H (Dab)], 2.85 [dd, 1H, $J = 8$ y 13.5 Hz, β -H (diFPhe)], 2.97 [m, 6H, 4H (pirrolidina) y γ -H (Dab)], 3.06 [dd, 1H, $J = 4$ y 13.5 Hz, β -H (diFPhe)], 4.33 [m, 3H, CH_2 -Ph y α -H (Dab)], 4.61 [m, 3H, CH_2 -pirrolidina y α -H (diFPhe)], 5.63 (s, 2H, CH_2 -diClPh), 6.54 [d, 1H, $J = 8$ Hz, NH (Urea)], 6.78 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NH-Boc), 7.01 [d, 1H, $J = 9$ Hz, 5-H (indazol)], 7.06 [m, 1H, 2-H (diFPh)], 7.27 [m, 7H, Ph, 5-H y 6-H (diFPh)], 7.43 [t, 1H, $J = 8$ Hz, 4-H (diClPh)], 7.54 [d, 2H, $J = 8$ Hz, 3-H y 5-H (diClPh)], 7.79 [d, 1H, $J = 9$ Hz, 4-H (indazol)], 7.99 [s, 1H, 7-H (indazol)], 8.49 [m, 2H, NH- CH_2 -Ph y α -NH (Dab)], 9.15 [s, 1H, NH (urea)]; **ESI-MS**, m/z : 891.5 $[\text{M}+1]^+$.

4.3.6.2. Procedimiento optimizado.

A una disolución del aminoindazol **36** (376 mg, 1 mmol), en THF anhidro (20 ml), previamente enfriada a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se añadió trifosgeno (104 mg, 0.35 mmol) y, a continuación, óxido de propileno lentamente (143 μl , 2 mmol). Tras 5 min de agitación, se añadió una disolución del dipéptido **41** (250 mg, 0.5 mmol) en THF anhidro (20 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en EtOAc (80 ml). La disolución se lavó sucesivamente con H_2O (2×25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml), se secó sobre

Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo fue tratado con CH₂Cl₂ frío (20 ml) y el precipitado obtenido se filtró y se lavó con CH₂Cl₂ (5 ml) frío obteniéndose la urea **42** como un sólido amarillo amorfo (406 mg, 91%) con 95% de pureza por HPLC.

4.3.7. *N*-Boc desprotección de la urea **42**. Obtención del producto RWJ-58259 (**3**)^{152,212}

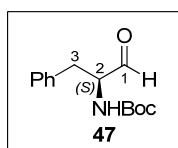


La urea *N*-Boc protegida **42** (400 mg, 0.45 mmol) se disolvió en disolución 3 N de HCl en MeOH (25 ml). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (10 ml) y la disolución se liofilizó obteniendo el

dihidrocloruro de RWJ-58259 como sólido amorfo de color amarillo pálido (355 mg, 100%) con pureza del 95% por HPLC. **HPLC-MS** [Xbridge C₁₈, gradiente 5-80% de A en B, 15 min]: *t_R* = 11.26 min; **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.77, 1.85 (2m, 4H, pirrolidina), 1.92 [m, 1H, β -H (Dab)], 2.03 [m, 1H, β -H (Dab)], 2.78 [m, 1H, γ -H (Dab)], 2.83 [dd, 1H, *J* = 8.5 y 14 Hz, β -H (diFPh)], 3.07 [m, 3H, 2H (pirrolidina) y β -H (diFPh)], 3.36 [m, 2H, pirrolidina], 4.29 (dd, 2H, *J* = 4.5 y 14 Hz, CH₂-Ph), 4.41 [dd, 1H, *J* = 8 y 14 Hz, α -H (Dab)], 4.57 [m, 3H, α -H (diFPh) y CH₂-pirrolidina], 5.60 (s, 2H, CH₂-diClPh), 6.70 [d, 1H, *J* = 8 Hz, NH (urea)], 7.00 [d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 5-H (indazol)], 7.07 [m, 1H, 6-H (diFPh)], 7.27 [m, 7H, Ph y 2-,5-H (diFPh)], 7.42 [t, 1H, *J* = 8 Hz, 4-H (diClPh)], 7.53 [d, 2H, *J* = 8.5 Hz, 3-,5-H (diClPh)], 7.81 [d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 4-H (indazol)], 7.98 [m, 4H, 7-H (indazol) y NH₃⁺ (Dab)], 8.65 [m, 2H, NH(Dab) y NH-CH₂-Ph], 9.30 [s, 1H, NH (urea)], 10.54 [m, 1H, NH⁺ (pirrolidina)]; **¹³C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22.7 [C₃ y C₄ (pirrolidina)], 30.1 [C β (Dab)], 36.1 [C γ (Dab)], 37.5 [C β (diFPh)], 42.1 [CH₂-Ph], 47.3 [CH₂-diClPh], 47.8 [CH₂-pirrolidina], 52.7 [C₂ y C₅ (pirrolidina)], 53.8 [C α (diFPh)], 96.1 [C₇ (indazol)], 114.5 [C₅ (indazol)], 116.9 y 117.7 [C₂ y C₅ (diFPh)], 118.3 [C_{3a} (indazol)], 120.7 [C₄ (indazol)], 126.3 [C₆ (diFPh)], 126.8, 127.1 y 128.3 [5CH (Ph)], 128.8 [C₃ y C₅ (diClPh)], 131.0 [C₄ (diClPh)], 131.5 [C₂ y C₆ (diClPh)], 136.1 [C₁ (diClPh)], 139.7 [C₁ (Ph)], 141.4 [C_{7a} (indazol)], 147.3 [C₃ (diFPh)], 148.0 [C₄ (diFPh)], 154.8 [CO (urea)], 170.5 [CO (diFPh)], 171.5 [CO (Dab)]. **ESI-MS**, *m/z*: 791.2 [M+1]⁺.

4.4. SÍNTESIS DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE Gly

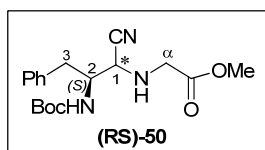
4.4.1. Producto de partida no comercial. Síntesis de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-fenilalaninal (Boc-Phe-H) (47)²³⁵



Sobre una disolución de Boc-Phe-OH (5.3 g, 20 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (100 ml) se adicionó sucesivamente hidrocloreuro de *N*-metoxi-*N*-metilamina (1.95 g, 20 mmol), dimetilaminopiridina (2.67 g, 22 mmol) y DCC (4.12 g, 20 mmol). Después de 12 h de agitación a temperatura ambiente, la dicitclohexilurea formada se separó de la mezcla de reacción por filtración. El filtrado obtenido se lavó sucesivamente con disolución 0.1 N de HCl (4×60 ml), H₂O (60 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 20-55% de EtOAc en hexano, para dar la *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Phe-OH en forma de sirupe (5.86 g, 95%). Seguidamente, sobre una suspensión de LiAlH₄ (1.44 g, 38 mmol) en THF anhidro (100 ml) enfriada a -78 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota, una disolución de la *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Phe-OH (5.86 g, 19 mmol) en THF anhidro (100 ml). Después de 1 h de la agitación a -78 °C, el exceso de hidruro se destruyó con disolución de KHSO₄ (4.12 g, 30.4 mmol) en H₂O (60 ml). A continuación, se añadió éter etílico (300 ml), y se mantuvo la agitación hasta que la mezcla adquirió temperatura ambiente. De este modo, se obtuvieron dos fases que fueron separadas. La fase acuosa se extrajo con éter etílico (2×150 ml) y los extractos orgánicos conjuntos se lavaron sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (100 ml), H₂O (100 ml) y disolución

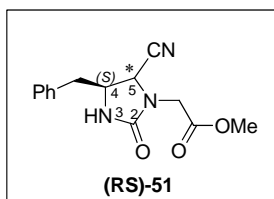
saturada de NaCl (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad, obteniendo el α -aminoaldehído **47** (3.98 g, 86%) como un sólido blanco. **Pf** 68-70 °C; $[\alpha]_D^{20}$: +2.9 (c 1.0, ClCl₃) [bibliog.: +2.9 (c 1.0, ClCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 1.39 (s, 3H, Boc), 3.10 (m, 2H, 3-H), 4.37 (m, 1H, 2-H), 4.96 (m, 1H, NH-Boc), 7.05-7.30 (m, 5H, Ph), 9.55 (s, 1H, 1-H).

4.4.2. Síntesis de pseudipéptidos Boc-Phe Ψ [(*RS*)CH(CN)NH]Gly-OMe [(*RS*)-50]



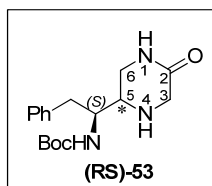
A una disolución de H-Gly-OMe-HCl (**48**) (1.00 g, 7.96 mmol) en MeOH (40 ml) se añadió TEA (1.1 ml, 7.96 mmol), y después de 15 min de agitación a temperatura ambiente la reacción se enfrió a -20 °C y se añadió ZnCl₂ (542 mg, 3.98 mmol) y el aldehído Boc-Phe-H (**47**) (992 mg, 3.98 mmol). Tras 1 h de agitación a esta temperatura, se añadió TMSCN (896 μ l, 7.16 mmol) y se agitó a 0 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en EtOAc (50 ml). La disolución se lavó sucesivamente con H₂O (2 \times 25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad para obtener la mezcla epimérica (*RS*)-**50** [(*R:S*) = (1:3)], que no pudo ser resuelta (sirupe, 1.24 g, 90%). **HPLC** [Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: t_R = 21.65 min [(*S*)-**50**] y 21.84 min [(*R*)-**50**]; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃). (*R*)-**50** δ (ppm): 1.35 (s, 9H, Boc), 2.84 (dd, 1H, J = 8.5 y 14 Hz, 3-H), 3.12 (dd, 1H, J = 6 y 14 Hz, 3-H), 3.50 [m, 1H, α -H (Gly)], 3.70 (d, 1H, J = 6 Hz, 1-H), 3.72 (s, 3H, OMe), 4.14 (m, 1H, 2-H), 4.83 (m, 1H, NHBoc), 7.26 (m, 5H, Ph). (*S*)-**50** δ (ppm): 1.36 (s, 9H, Boc), 2.90 (dd, 1H, J = 7.5 y 14 Hz, 3-H), 2.96 (dd, 1H, J = 9.5 y 14 Hz, 3-H), 3.5 [m, 2H, α -H (Gly)], 3.69 (s, 3H, OMe), 3.72 (d, 1H, J = 6 Hz, 1-H), 4.24 (m, 1H, 2-H), 4.83 (m, 1H, NHBoc), 7.26 (m, 5H, Ph); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃). (*R*)-**50** δ (ppm): 28.1 [CH₃ (Boc)], 38.2 [C₃], 48.3 [C α (Gly)], 52.0 [OMe], 53.4 [C₁ y C₂], 80.3 [C (Boc)], 118.1 [CN], 126.9, 128.6, 129.1, 136.0 [Ph], 155.5 [CO (Boc)], 171.3 [CO₂]. (*S*)-**50** δ (ppm): 28.1 [CH₃ (Boc)], 38.2 [C₃], 48.4 [C α (Gly)], 52.0 [OMe], 53.9 [C₁ y C₂], 80.3 [C (Boc)], 117.5 [CN], 127.0, 128.7, 129.0, 136.0 [Ph], 155.5 [CO (Boc)], 171.0 [CO₂]; **ES-MS**, m/z : 348.4 (100%) [M+1]; **Análisis elemental** calculado para C₁₈H₂₅N₃O₄ (%): C: 62.23, H: 7.25, N: 12.10. Encontrado (%): C: 62.21 H: 7.19 N: 12.01.

4.4.3. Síntesis de (4*S*,5*RS*)-5-ciano-4-fenilmetil-1-(metoxycarbonilmetil)-2-oxoimidazolidina [(*RS*)-**51**]



La mezcla epimérica Boc-PheΨ[(*RS*)CH(CN)NH]Gly-OMe [(*RS*)-**50**] (100 mg, 0.28 mmol) se disolvió en disolución 3 N de HCl en EtOAc (5 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (2 ml) y la disolución se liofilizó. El liofilizado se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) y a la disolución se añadió TEA (78 μl, 0.56 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se añadió trifosgeno (33 mg, 0.11 mmol) y, a continuación, TEA (93 μl, 0.67 mmol). Tras 2 h de agitación a 0 °C, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 ml) y se lavó sucesivamente con H₂O (2×5 ml) y disolución saturada de NaCl (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía radial, utilizando como eluyente gradiente 0-15% de MeOH en CH₂Cl₂ para dar las 2-imidazolidinonas (*RS*)-**51** (sirupe, 46 mg, 60%) en proporción (1:3), que no se pudieron resolver. **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: *t_R*= 15.62 min [(*R*)-**51**] y 15.94 min [(*S*)-**51**]; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃). (*R*)-**51** δ (ppm): 2.96 (m, 2H, CH₂-Ph), 3.69 [d, 1H, *J* = 18.5 Hz, CH₂ (Gly)], 3.79 (s, 3H, OMe), 4.12 (m, 1H, 4-H), 4.51 [d, 1H, *J* = 18.5 Hz, CH₂ (Gly)], 4.56 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 5-H), 5.06 (s, 1H, 3-H), 7.21-7.40 (m, 5H, Ph). (*S*)-**51** δ (ppm): 3.04 (dd, 1H, *J* = 9.5 y 13.5 Hz, CH₂-Ph), 3.16 (dd, 1H, *J* = 5 y 13.5 Hz, CH₂-Ph), 3.71 [d, 1H, *J* = 18.5 Hz, CH₂ (Gly)], 3.76 (s, 3H, OMe), 4.19 (m, 1H, 4-H), 4.55 [d, 1H, *J* = 18.5 Hz, CH₂ (Gly)], 4.86 (s, 1H, 3-H), 4.91 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 5-H), 7.21-7.40 (m, 5H, Ph); **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃). (*R*)-**51** δ (ppm): 41.0 [CH₂-Ph], 42.5 [CH₂ (Gly)], 50.9 [C₅], 52.5 [OMe], 55.9 [C₄], 116.0 [CN], 127.6, 128.5, 129.2, 134.8 [Ph], 158.4 [C₂], 169.2 [CO₂]; (*S*)-**51** δ (ppm): 38.7 [CH₂-Ph], 42.9 [CH₂ (Gly)], 51.8 [C₅], 52.5 [OMe], 52.9 [C₄], 114.3 [CN], 127.6, 128.5, 129.2, 135.2 [Ph], 158.7 [C₂], 169.2 [CO₂]; **ESI-MS**, *m/z*: 274.4 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₁₄H₁₅N₃O₃ (%): C: 61.53, H: 5.53, N: 15.38. Encontrado (%): C: 61.42, H: 5.39, N: 15.14.

4.4.4. Síntesis de (5*RS*)-5-[(1*S*)-1-*tert*-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-2-oxopiperazina [(*RS*)-53]



Método A: Hidrogenación catalítica en presencia de Pd(C)

Una disolución de la mezcla epimérica (1:3) Boc-PheΨ[(*RS*)CH(CN)NH]Gly-OMe (**(*RS*)-50**) (1.00 g, 2.88 mmol) en MeOH (15 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ durante 72 h en presencia de Pd (C) al 10% (1.00 g). Transcurrido este tiempo se filtró el catalizador y se lavó con MeOH (10 ml). Los filtrados se evaporaron a sequedad, y el residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂ para dar la mezcla de 2-oxopiperazinas (**(*RS*)-53**) (sólido blanco, 294 mg, 32%) en proporción (3:1) que no se pudo resolver. **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: *t_R* = 12.04 min [(**(*R*)-53**)] y 12.34 min [(**(*S*)-53**)]; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃). (**(*R*)-53**) δ (ppm): 1.36 (s, 3H, Boc), 2.90 (m, 1H, 5-H), 2.92 (m, 1H, CH₂-Ph), 2.97 (dd, 1H, *J* = 5 y 14 Hz, CH₂-Ph), 3.24, 3.30 (m, 2H, 6-H), 3.48 (d, 1H, *J* = 18 Hz, 3-H), 3.60 (d, 1H, *J* = 18 Hz, 3-H), 3.88 (m, 1H, 5-CH), 6.13 (s, 1H, 1-H), 7.11-7.37 (m, 5H, Ph). (**(*S*)-53**) δ (ppm): 1.38 (s, 3H, Boc), 2.90 (m, 3H, 5-H y CH₂-Ph), 3.22, 3.40 (m, 2H, 6-H), 3.42 (d, 1H, *J* = 17.5 Hz, 3-H), 3.58 (d, 1H, *J* = 17.5 Hz, 3-H), 3.90 (m, 1H, 5-CH), 6.02 (s, 1H, 1-H), 7.11-7.37 (m, 5H, Ph); **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃). (**(*R*)-53**) δ (ppm): 28.4 [CH₃ (Boc)], 37.2 [CH₂-Ph], 45.6 [C₆], 49.1 [C₃], 53.4 [C₅-CH], 54.8 [C₅], 80.0 [C (Boc)]; 126.8, 128.8, 129.5, 137.3 [Ph], 155.9 [CO (Boc)], 169.9 [C₂]. (**(*S*)-53**) δ (ppm): 28.4 [CH₃ (Boc)], 38.9 [CH₂-Ph], 45.6 [C₆], 49.3 [C₃], 52.8 [C₅-CH], 53.4 [C₅], 80.0 [C (Boc)]; 126.9, 128.9, 129.3, 137.5 [Ph], 155.6 [CO (Boc)], 170.2 [C₂]; **ESI-MS**, *m/z*: 320.2 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₁₇H₂₅N₃O₃ (%): C: 63.93, H: 7.89, N: 13.16. Encontrado (%): C: 63.76, H: 8.04, N: 13.31.

Método B: Hidrogenación catalítica en presencia de Ni Raney

Se repitió el procedimiento anterior utilizando Ni Raney (1.50 g) como catalizador. La reacción transcurrió durante 5 h y el catalizador se filtró sobre celita. De esta forma, se obtuvo la mezcla de 2-oxopiperazinas (**(*RS*)-53**) (598 mg, 65%).

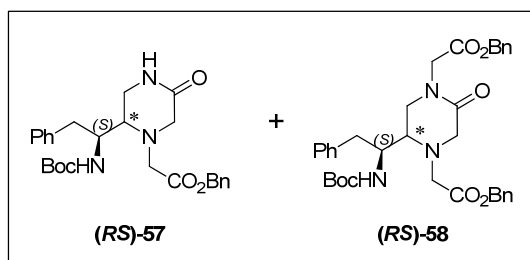
Método C: Reducción con hidrato de hidracina y Ni Raney

A una disolución de la mezcla de aminonitrilos **(RS)-50** (1.00 g, 2.88 mmol) en MeOH (50 ml), se añadió Ni Raney (1.00 g) e hidrato de hidrazina (2.8 ml, 57.6 mmol) y la mezcla se agitó a 60 °C durante 1 h. A continuación, se filtró el catalizador sobre celita y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂ para dar la mezcla de 2-oxopiperazinas **(RS)-53** (470 mg, 50%).

Método D: Reducción con NaBH₄ en presencia de CoCl₂

A una disolución de la mezcla de aminonitrilos **(RS)-50** (1.00 g, 2.88 mmol) en MeOH (50 ml), se añadió lentamente NaBH₄ (1.00 g, 28.8 mmol) y CoCl₂ (750 mg, 5.8 mmol), dejando alcanzar temperatura ambiente. Tras 1 h de agitación, el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en EtOAc (100 ml) y la disolución se lavó sucesivamente con H₂O (2×25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂, para obtener la mezcla **(RS)-53** (130 mg, 14%).

4.4.5. N-alquilación de las 2-oxopiperazinas (RS)-53. Síntesis de (5RS)-4-benciloxicarbonilmetil-5-[(1S)-1-terc-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(RS)-57] y (5RS)-1,4-benciloxicarbonilmetil-5-[(1S)-1-terc-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(RS)-58]



Método A: A presión atmosférica

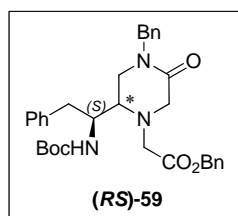
A una disolución de la mezcla (3:1) de 2-oxopiperazinas **(RS)-53** (100 mg, 0.31 mmol) en THF anhidro o CH₃CN anhidro (según se indica en la Tabla 2.3 de la discusión de resultados), se añadió bajo atmósfera de argón la base correspondiente (NaH, Cs₂CO₃ o K₂CO₃) (0.34 mmol) y, después de 5 min de agitación a temperatura ambiente, bromoacetato de bencilo (68 µl, 0.34 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C hasta

completar la reacción (3 días para K_2CO_3 , 5 días para Cs_2CO_3 y 6 días para NaH). Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente. El residuo obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (100 ml), la disolución se lavó sucesivamente con agua (25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH_2Cl_2 , obteniéndose las mezclas epiméricas en forma de sirupe **(RS)-57** y **(RS)-58**, con rendimientos indicados en la Tabla 2.3 (entradas 1-3, Apartado 2.2.3, discusión de resultados). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-57** y **(RS)-58** se recogen en la Tabla 4.1 (Anexo III).

Método B: Asistida por MW

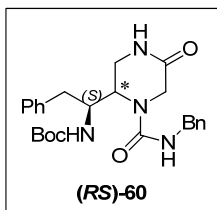
Se repitió el procedimiento anterior utilizando K_2CO_3 (64 mg, 0.47 mmol) y bromoacetato de bencilo (93 μ l, 0.47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 150 °C utilizando MW como fuente de calefacción durante 20 min, obteniendo **(RS)-57** (87mg, 60%).

4.4.6. Síntesis de (5RS)-1-bencil-4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1S)-1-terc-butoxicarbonilamino-2-feniletil]-2-oxopiperazina [(RS)-59]



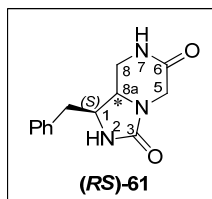
A una disolución de la mezcla (3:1) de 2-oxopiperazinas **(RS)-57** (100 mg, 0.22 mmol) en CH_3CN anhidro, se añadió, bajo atmósfera de argón, la base correspondiente según se indica en la Tabla 2.4 (Entrada 3 y 6, Apartado 2.2.3) (0.66 mmol) y bromuro de bencilo (78 μ l, 0.66 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 150 °C, utilizando MW como fuente de calefacción, durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a sequedad. El residuo así obtenido, se disolvió en EtOAc (100 ml), la disolución se lavó sucesivamente con agua (20 ml) y disolución saturada de NaCl (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 20-50% de EtOAc en Hexano, obteniéndose la mezcla epimérica en forma de sirupe **(RS)-59** en proporción (3:1), que no se pudo resolver, con los rendimientos indicados en la Tabla 2.4 (entrada 3 y 6, Apartado 2.2.3, discusión de resultados). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-59** se muestran en la Tabla 4.1 (Anexo III).

4.4.7. Síntesis de (5*RS*)-4-bencilaminocarbonil-5-[(1*S*)-1-*tert*-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-2-oxopiperazina [(*RS*)-60]



A una disolución de la mezcla epimérica (3:1) de 2-oxopiperazinas (**(*RS*)-53**) (100 mg, 0.31 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (25 ml), se añadió isocianato de bencilo (39 µl, 0.31 mmol). Después de 3h de agitación, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó sucesivamente con agua (25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose la correspondiente mezcla de ureas (**(*RS*)-60**) (sirupe, 123 mg, 86%) en proporción (3:1) que no se pudo resolver. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de (**(*RS*)-60**) se muestran en la Tabla 4.2 (Anexo III).

4.4.8. Síntesis de (8*aRS*)-(1*S*)-1-bencil-3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazina [(*RS*)-61]



4.4.8.1. A partir de las 2-oxopiperazinas (*RS*)-53

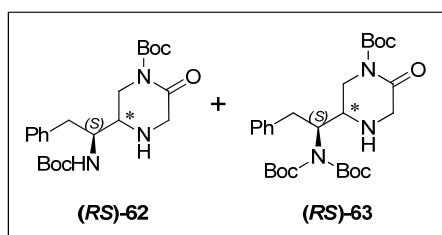
La mezcla de 2-oxopiperazinas (**(*RS*)-53**) (100 mg, 0.31 mmol) fue disuelta en disolución 3N de HCl en EtOAc (5 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (2 ml) y se liofilizó. El liofilizado se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) y a esta disolución se añadió TEA (87 µl, 0.62 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se añadió trifosgeno (36 mg, 0.12 mmol) y, a continuación, TEA (101 µl, 0.73 mmol). Tras 2 h de agitación a 0 °C, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 ml) y se lavó sucesivamente con H₂O (2×5 ml) y disolución saturada de NaCl (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂ para dar la mezcla de imidazopirazinas (**(*RS*)-61**) (sirupe, 46 mg, 60%) en proporción (3:1) que no se pudo resolver. **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: *t_R*= 10.62 min; **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃). (**(*R*)-61**) δ (ppm): 2.77 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, 1-CH₂), 2.94 (ddd, 1H,

$J = 4,5$ y 12 Hz, 8-H), 3.37 (t, 1H, $J = 12$ Hz, 8-H), 3.43 (d, 1H, $J = 18$ Hz, 5-H), 3.72 (ddd, 1H, $J = 5, 7.5$ y 12 Hz, 8a-H), 3.93 (d, 1H, $J = 18$ Hz, 5-H), 4.09 (q, 1H, $J = 7.5, 1$ -H), 6.79 (m, 1H, 2-H), 7.14-7.40 (m, 5H, Ph), 7.95 (d, 1H, $J = 4$ Hz, 7-H). **(S)-61** δ (ppm): 2.77 (m, 2H, 1-CH₂), 2.68 (m, 1H, 8-H), 2.85 (dd, 1H, $J = 5$ y 13 Hz, 8-H), 3.40 (d, 1H, $J = 18$ Hz, 5-H), 3.50 (m, 1H, 8a-H), 3.83 (d, 1H, $J = 18$ Hz, 5-H), 4.09 (m, 1H, 1-H), 6.94 (m, 1H, 2-H), 7.14-7.40 (m, 5H, Ph), 7.84 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 7-H); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃). **(R)-61** δ (ppm): 35.4 [C₁-CH₂], 39.8 [C₈], 44.2 [C₅], 52.9 [C_{8a}], 53.3 [C₁], 127.1, 129.2, 129.4, 138.5 [Ph], 160.7 [C₃], 166.9 [C₆]. **(S)-61** δ (ppm): 35.4 [C₁-CH₂], 44.2 [C₅], 44.3 [C₈], 54.6 [C₁], 55.0 [C_{8a}], 127.2, 129.1, 130.0, 137.7 [Ph], 159.7 [C₃], 167.0 [C₆]; **ESI-MS**, m/z : 246.3 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₁₃H₁₅N₃O₂ (%): C: 63.66, H: 6.16, N: 17.13. Encontrado (%): C: 63.80, H: 6.02, N: 17.28.

4.4.8.2. A partir de (4S,5RS)-5-ciano-4-fenilmetil-1-(metoxycarbonilmetil)-2-oxoimidazolidina [(RS)-51]

Una disolución de la mezcla epimérica de imisazolidinas **(RS)-51** (100 mg, 0.29 mmol) en MeOH (5 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ durante 5 h en presencia Ni Raney (150 mg) como catalizador. A continuación, el catalizador se filtró sobre celita y se lavó con MeOH (5 ml). Los filtrados se evaporaron a vacío y el residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂ para dar la mezcla de imidazopirazinas **(RS)-61** (sirupe, 68 mg, 65%) en proporción (3:1) que no se pudo resolver.

4.4.9. N-Boc-protección de las 2-oxopiperazinas 53. Síntesis de (5RS)-5-[(1S)-1-terc-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-1-(terc-butoxicarbonil)-2-oxopiperazina [(RS)-62] y (5RS)-1-terc-butoxicarbonil-5-[(1S)-1-di(terc-butoxicarbonil)amino-2-feniletíl]-2-oxopiperazina [(RS)-63]

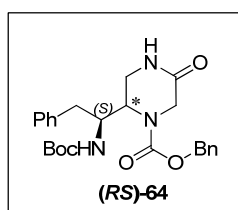


A una disolución de la mezcla (3:1) de 2-oxopiperazinas **(RS)-53** (100 mg, 0.31 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (25 ml) se añadió pirocarbonato de di-terc-butilo (213 μ l, 0.93 mmol), DMAP (38 mg, 0.31 mmol) y TEA (44 μ l, 0.31 mmol). La reacción se agitó

a 50 °C durante 4 h. Transcurrido este tiempo, la reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó sucesivamente con disolución al 10% de HCl (20 ml), disolución saturada de

NaHCO₃ (20 ml) y disolución saturada de NaCl (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂. De esta forma, se obtuvieron la mezcla de 1-Boc-2-oxopiperazinas **(RS)-62** (sirupe, 69 mg, 52%), junto con la mezcla epimérica correspondiente a los derivados tri(Boc) sustituidos **(RS)-63** (sirupe, 79 mg, 48%). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-62** y **(RS)-63** se muestran en la Tabla 4.2 (Anexo III).

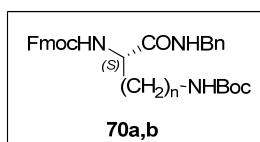
4.4.10. *N-Z*-protección de las 2-oxopiperazinas 53. Síntesis de **(5RS)-4-benciloxycarbonil-5-[(1S)-1-*tert*-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-2-oxopiperazina [(RS)-64]**



A una disolución de la mezcla epimérica (3:1) de 2-oxopiperazinas **53** (100 mg, 0.31 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (25 ml), enfriada a 0 °C, se añadió sucesivamente óxido de propileno (66 µl, 0.93 mmol) y cloroformiato de bencilo (135 µl, 0.393 mmol). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂, obteniendo las 4-benciloxycarbonil-2-oxopiperazinas **(RS)-64** (sirupe, 127 mg, 90%) en proporción (3:1), que no se pudieron resolver. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-64** se muestran en la Tabla 4.2 (Anexo III).

4.4.11. Procedimiento general de síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en N₁. Método A

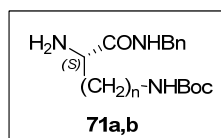
4.4.11.1. Formación de las α-aminobencilamidas 70a,b a partir de los α-aminoácidos N_α-Fmoc protegidos 69a,b



Sobre una disolución de **69a,b** (10 mmol) en CH₃CN anhidro (200 ml) bajo atmósfera de Ar, se adicionó sucesivamente HOBt (1.35 g, 10 mmol), BnNH₂ (1.06 ml, 10 mmol) y DCC (4.13 g, 20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, el precipitado formado se filtró y se lavó varias veces con CH₃CN frío, obteniendo de

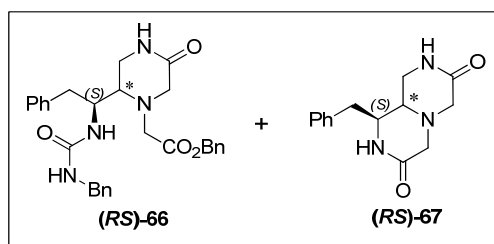
forma cuantitativa las bencilamidas **70a,b** en forma de sólidos blancos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen en la Tabla 4.3 (Anexo).

4.4.11.2. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Fmoc. Síntesis de **71a,b**



Sobre una disolución de las aminobencilamidas *N*-Fmoc protegidas **70a,b** (10 mmol) en CH₃CN (200 ml), se adicionó Et₂NH (10.4 ml, 100 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, el precipitado formado se filtró, se lavó varias veces con CH₃CN frío y la disolución resultante se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna flash, utilizando como eluyente gradiente del 0-20% de MeOH en EtOAc. Así, se obtuvieron cuantitativamente **71a,b** en forma de sólidos blancos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen en la Tabla 4.4 (Anexo III).

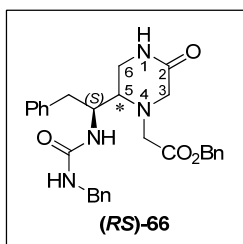
4.4.11.3. Eliminación del grupo protector Boc de (RS)-57 y reacción con isocianato de bencilo. Síntesis de (5RS)-4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1S)-1-(3-bencilureido)-2-feniletíl]-2-oxo-piperazina [(RS)-66] y (9aRS)-(1S)-1-bencil-3,7-dioxooctahidro-1H-pirazino[1,2-a]pirazina [(RS)-67]



La mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas (**RS**)-57 (500 mg, 1.07 mmol) se disolvió en disolución 3 N de HCl en EtOAc (20 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se

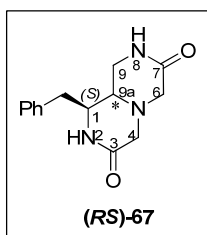
disolvió en H₂O (8 ml) y la disolución se liofilizó. El liofilizado se disolvió en THF anhidro (40 ml), se añadió bencilisocianato (199 µl, 1.61 mmol) y a continuación TEA lentamente (224 µl, 1.61 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (60 ml) y se lavó sucesivamente con H₂O (2×10 ml) y disolución saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-5% de MeOH en EtOAc para dar la mezcla epimérica de ureas (**RS**)-66 en proporción (3:1) (sirupe, 215 mg, 40%), que no se pudo

resolver, y como subproducto, la mezcla de dioxopirazinopirazinas (**RS**)-**67** (sirupe, 83 mg, 30%).



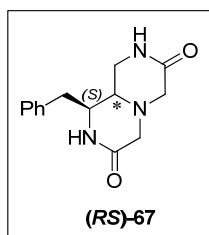
(5RS)-4-benciloxycarbonilmetil-5-[(1S)-1-(3-bencilureido)-2-fenil etil]-2-oxopiperazina [(RS)-66]. HPLC [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% A en B, 30 min]: t_R = 20.02 min (**R**)-**66**] y 21.24 min (**S**)-**66**];

HPLC-MS [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 5 min]: t_R = 4.29 min; **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃), (**R**)-**66** δ (ppm): 2.56 (dd, 1H, J = 10.5 y 13.5 Hz, CH₂-Ph), 2.82 (dd, 1H, J = 4 y 13.5 Hz, CH₂-Ph), 3.06 (dt, 1H, J = 4.5 y 9 Hz, 5-H), 3.24 (m, 1H, 6-H), 3.26 (d, J = 18 Hz, 3-H), 3.43 (s, 2H, CH₂-CO₂Bn), 3.46 (d, 1H, J = 18 Hz, 3-H), 3.60 (m, 1H, 6-H), 3.89 (m, 1H, 5-CH), 4.32 (d, 1H, J = 5.5 Hz, NH-CH₂-Ph), 5.04 (m, 1H, NH-CH₂-Ph), 5.10 (s, 2H, CO₂-CH₂-Ph), 5.45 (m, 1H, 1-H), 5.70 (m, 1H, 5-CH-NH), 7.14-7.35 (m, 15H, Ar). (**S**)-**66** δ (ppm): 2.56 (m, 1H, CH₂-Ph), 2.82 (m, 1H, CH₂-Ph), 3.06 (m, 1H, 5-H), 3.24 (m, 1H, 6-H), 3.50 (d, J = 17.5 Hz, 3-H), 3.43 (s, 2H, CH₂-CO₂Bn), 3.58 (d, 1H, J = 17.5 Hz, 3-H), 3.60 (m, 1H, 6-H), 3.89 (m, 1H, 5-CH), 4.32 (m, 1H, NH-CH₂-Ph), 5.04 (m, 1H, NH-CH₂-Ph), 5.10 (s, 2H, CO₂-CH₂-Ph), 5.45 (m, 1H, 1-H), 5.70 (m, 1H, 5-CH-NH), 7.14-7.35 (m, 15H, Ar); **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃), (**R**)-**66** δ (ppm): 36.7 [C₆], 37.4 (CH₂-Ph), 44.5 [NH-CH₂-Ph], 51.3 [C₃ y CH₂CO₂Bn], 53.0 [C₅-CH], 58.0 [C₅], 66.9 [CO₂CH₂Ph], 127.3, 127.4, 127.6, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.0, 129.2 [CH (Ar)], 135.2 [C (Ar), CO₂CH₂-Ph], 136.0 [C (Ar), Ph-CH₂], 139.3 [C (Ar), NHCH₂-Ph], 158.2 [NH-CO-NH], 169.2 [C₂], 171.0 [CO₂]. (**S**)-**66** δ (ppm): 36.7 [C₆], 37.4 (CH₂-Ph), 44.5 [NH-CH₂-Ph], 51.3 [CH₂CO₂Bn], 53.0 [C₅-CH], 55.6 [C₃], 58.0 [C₅], 66.9 [CO₂CH₂Ph], 127.3, 127.4, 127.6, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.0, 129.2 [CH (Ar)], 135.2 [C (Ar), CO₂CH₂-Ph], 136.0 [C (Ar), Ph-CH₂], 139.3 [C (Ar), NHCH₂-Ph], 158.2 [NH-CO-NH], 169.2 [C₂], 171.0 [CO₂]; **ESI-MS**, m/z : 501.2 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₂₉H₃₂N₄O₄ (%): C: 69.58, H: 6.44, N: 11.19. Encontrado (%): C: 69.73, H: 6.32, N: 11.45.



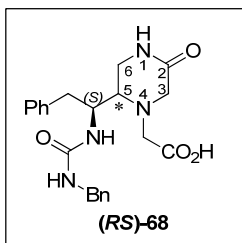
(9aRS)-(1S)-1-bencil-3,7-dioxooctahidro-1H-pirazino[1,2-a]pirazina [(RS)-67]. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de esta mezcla epimérica se muestran en la Tabla 4.5 (Anexo III).

4.4.11.4. Síntesis de (9aRS)-(1S)-1-bencil-3,7-dioxooctahidro-1H-pirazino[1,2-a]pirazina [(RS)-67]



La mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas (**RS**)-57 (145 mg, 0.31 mmol) se disolvió en disolución 3N de HCl en EtOAc (5 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (2 ml) y la disolución se liofilizó. El liofilizado se disolvió en CH₃CN (5 ml) y a la disolución se añadió TEA (43 µl, 1.24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C utilizando MW como fuente de calefacción durante 40 min. Pasado este tiempo, el disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose la mezcla de 3,7-dioxopirazinopirazinas (**RS**)-67 (sirupe, 64 mg, 80%) en proporción (3:1), que no se pudo resolver. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de (**RS**)-67 se muestran en la Tabla 4.5 (Anexo III).

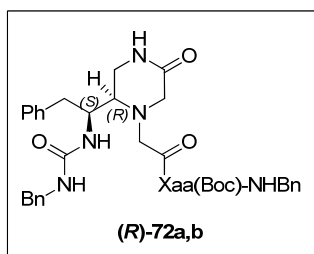
4.4.11.5. Síntesis de (5RS)-5-[(1S)-1-(3-bencilureido)-2-feniletíl]-4-(2-carboximetil)-2-oxopiperazina [(RS)-68]



Una disolución de la mezcla epimérica de ureas (**RS**)-66 (200 mg, 0.40 mmol) en MeOH (25 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ durante 1 h en presencia de Pd (C) al 10% (20 mg). A continuación, el catalizador se filtró y se lavó con MeOH (10 ml). Los filtrados se evaporaron a vacío para obtener la mezcla de 2-oxopiperazinas (**RS**)-68 (sirupe, 164.2 mg, 100%), que no se pudo resolver, en proporción (3:1). **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: *t_R* = 13.65 min [(**R**)-68] y 14.05 min [(**S**)-68]; **HPLC-MS** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 5 min]: *t_R* = 3.08 min; **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-d₆), (**R**)-68 δ (ppm): 2.74 (d, 2H, *J* = 8 Hz, CH₂-Ph), 2.89 (m, 1H, 5-H), 3.23 (m, 1H, 6-H), 3.26 (s, 2H, CH₂-CO₂H), 3.34 (d, 1H, *J* = 17.5 Hz, 3-H), 3.39 (m, 1H, 6-H), 3.46 (d, 1H, *J* = 17.5 Hz, 3-H), 3.76 (m, 1H, 5-CH), 4.20 (t, 1H, *J* = 6 Hz, NH-CH₂-Ph), 6.04 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, 1-H), 6.46 (t, 1H, *J* = 6 Hz, NH-CH₂-Ph), 7.17-7.32 (m, 10H, Ar), 7.53 (d, 1H, *J* = 2 Hz, 5-CH-NH). (**S**)-68 δ (ppm): 2.74 (m, 2H, CH₂-Ph), 2.89 (m, 1H, 5-H), 3.23 (m, 1H, 6-H), 3.26 (s, 2H, CH₂-CO₂H), 3.34 (m, 1H, 3-H), 3.39 (m, 1H, 6-H), 3.46 (m, 1H, 3-H), 4.10 (m, 1H, 5-CH), 4.20 (m, 1H, NH-CH₂-Ph), 6.24 (m, 1H, 1-H), 6.60 (m, 1H, NH-CH₂-Ph), 7.17-7.32 (m, 10H, Ar), 7.53 (m, 1H, 5-

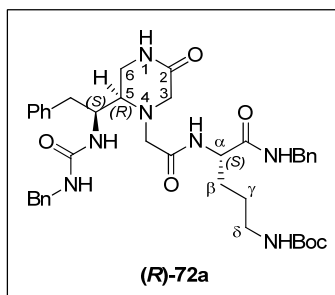
CH-NH); ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6), (**R**)-**68** δ (ppm): 36.0 [C_6], 36.3 [CH_2 -Ph], 42.9 [NH-CH_2 -Ph], 52.4 [$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$], 54.1 [C_5 -CH], 54.3 [C_3], 57.4 [C_5], 126.3, 126.5, 127.0, 128.2, 128.4, 129.2 [CH (Ar)], 137.9 [C (Ar), Ph- CH_2], 140.9 [C (Ar), NHCH_2 -Ph], 157.9 [NH-CO-NH], 168.3 [C_2], 172.1 [CO_2]. (**S**)-**68** δ (ppm): 36.0 [C_6], 36.3 (CH_2 -Ph), 42.9 [NH-CH_2 -Ph], 52.4 [$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$], 54.1 [C_5 -CH], 54.3 [C_3], 57.4 [C_5], 126.3, 126.5, 127.0, 128.2, 128.4, 129.2 [CH (Ar)], 137.9 [C (Ar), Ph- CH_2], 140.9 [C (Ar), NHCH_2 -Ph], 157.9 [NH-CO-NH], 168.3 [C_2], 172.1 [CO_2]. **ESI-MS**, m/z : 411.9 (100%) [$\text{M}+1$] $^+$; **Análisis elemental** calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$ (%): C: 64.37, H: 6.38, N: 13.65. Encontrado (%): C: 64.51, H: 6.19, N: 13.88.

4.4.11.6. Procedimiento general para la síntesis de ureas pseudotripeptídicas (**R**)-**72a,b**



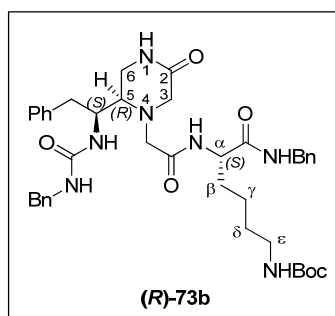
A una disolución de la mezcla epimérica de ureas en proporción 3:1 (**RS**)-**68** (90 mg, 0.22 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (8 ml), se añadió sucesivamente HOBt (30 mg, 0.22 mmol), DIC (68 μl , 0.44 mmol) y una disolución de la bencilamida derivada del aminoácido correspondiente [Orn(Boc)- NHBn (**71a**) o

Lys(Boc)- NHBn (**71b**)] (0.33 mmol) en DMF anhidro (2 ml). La mezcla se agitó durante 24 h y se evaporó el disolvente a sequedad. El residuo se disolvió en EtOAc (50 ml) y se lavó con disolución de ácido cítrico al 10% (2×10 ml), disolución saturada de NaHCO_3 (2×10 ml) y disolución saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-10% de MeOH en EtOAc obteniéndose las 2-oxopiperazinas (**R**)-**72a,b**, en forma de sirupe, con rendimientos del 36 y 30% respectivamente. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen a continuación.



(**R**)-**72a**. $[\alpha]_D^{20}$: -1.8 (c 1.0, CH_2Cl_2); **HPLC** [Sunfire C_{18} , Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: t_R = 20.19 min; **HPLC-MS** [Sunfire C_{18} , Gradiente 10-100% de A en B, 5 min]: t_R = 4.30 min; ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.25 (m, 2H, γ -H), 1.34 (s, 3H, Boc), 1.51, 1.65 (2m, 2H, β -H), 2.75 (m, 3H, CH_2 -Ph y 5-H), 2.85 (m, 2H, δ -H), 3.14 (d, 1H, J = 17.5 Hz, 3-H), 3.20 (d, 1H, J = 17 Hz, CH_2 -CO), 3.26 (m, 1H, 6-H), 3.31 (d, 1H, J = 17 Hz, CH_2 -CO), 3.34 (d, 1H, J = 17.5 Hz, 3-H), 3.39 (m, 1H, 6-H), 3.90 (m, 1H, 5-CH), 4.20

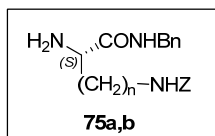
[m, 1H, NH-CH₂-Ph (Urea)], 4.27 (m, 3H, α-H y NH-CH₂-Ph), 6.13 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, 1-H), 6.41 [m, 1H, NH-CH₂ (Urea)], 6.78 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, NH-Boc), 7.13-7.40(m, 15H, Ar), 7.53 (m, 1H, 5-CH-NH), 7.85 (d, 1H, *J* = 8 Hz, α-NH), 8.49 (t, 1H, *J* = 6 Hz, CONH); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 25.9 [C_γ], 28.3 [CH₃ (Boc)], 29.7 [C_β], 35.1 [C₆], 36.4 (CH₂-Ph), 40.1 [C_δ], 42.0 [NH-CH₂-Ph], 43.0 [NH-CH₂-Ph (Urea)], 51.8 [C_α], 52.3 [C₃], 53.9 [C₅-CH], 57.3 [CH₂CO], 57.7 [C₅], 77.4 [C (Boc)], 126.3, 126.5, 126.8, 127.0, 128.2, 128.3, 128.4, 129.1 [CH (Ar)], 137.6 [C (Ar), Ph-CH₂], 139.2 [C (Ar), NHCH₂-Ph], 140.8 [C (Ar), NHCH₂-Ph (Urea)], 155.6 [CO (Boc)], 157.9 [NH-CO-NH], 168.1 [C₂], 169.5 [CO₂], 171.5 [CONH]; **ESI-MS**, *m/z*: 714.5 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₃₉H₅₁N₇O₆ (%): C: 65.62, H: 7.20, N: 13.73. Encontrado (%): C: 65.41, H: 7.36, N: 13.90.



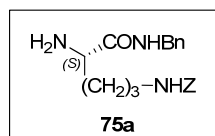
(R)-72b. [α]_D²⁰: -14 (c 1.1, CH₂Cl₂); **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: *t_R* = 20.80 min; **HPLC-MS** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 5 min]: *t_R* = 4.63 min; ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (m, 2H, γ-H), 1.38 (s, 3H, Boc), 1.43 (m, 2H, δ-H), 1.59, 1.83 (2m, 2H, β-H), 2.60 (t, 1H, *J* = 14 Hz, CH₂-Ph), 2.92 (d, 1H, *J* = 14 Hz, CH₂-Ph), 2.98 (m, 1H, ε-H), 3.07 (m, 2H, ε-H y 5-H), 3.20 (m, 2H, 3-H y 6-H), 3.34 (m, 2H, CH₂-CO), 3.56 (d, 1H, *J* = 18 Hz, 3-H), 3.90 (m, 1H, 6-H), 3.97 (m, 1H, 5-CH), 4.26 (d, 2H, *J* = 6 Hz, NH-CH₂-Ph), 4.30, 4.40 [2d, 2H, *J* = 14 Hz, NH-CH₂-Ph (Urea)], 4.44 (m, 1H, α-H), 4.76 [m, 1H, NH-Boc], 5.62 (s, 1H, 1-H), 5.74 (m, 1H, 5-CH-NH), 6.05 [s, 1H, NH-CH₂ (Urea)], 7.09 (m, 1H, CONH), 7.13-7.40 (m, 15H, Ar), 7.96 (m, 1H, α-NH); ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22.5 [C_γ], 28.4 [CH₃ (Boc)], 29.3 [C_δ], 32.6 [C_β], 36.0 [C₆], 37.7 (CH₂-Ph), 39.8 [C_ε], 43.6 [NH-CH₂-Ph], 44.3 [NH-CH₂-Ph (Urea)], 52.0 [C₃], 52.6 [C_α y C₅-CH], 57.4 [CH₂CO], 58.7 [C₅], 79.3 [C (Boc)], 126.3, 126.5, 126.7, 126.9, 127.0, 128.1, 128.2, 128.3, 129.0 [CH (Ar)], 135.7 [C (Ar), Ph-CH₂], 137.4 [C (Ar), NHCH₂-Ph], 139.6 [C (Ar), NHCH₂-Ph (Urea)], 156.3 [CO (Boc)], 158.4 [NH-CO-NH], 168.5 [C₂], 169.7 [CO₂], 172.1 [CONH]; **ESI-MS**, *m/z*: 728.5 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₄₀H₅₃N₇O₆ (%): C: 66.00, H: 7.34, N: 13.47. Encontrado (%): C: 66.18, H: 7.17, N: 13.60.

4.4.12. Procedimiento general de síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas no sustituidas en N₁. Método B

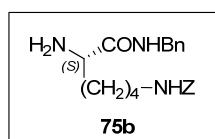
4.4.12.1. Productos de partida no comerciales. Formación de las α -aminobencilamidas **75a,b** a partir de los α -aminoácidos N α -Boc protegidos **74a,b**



Sobre una disolución de **74a,b** (10 mmol) en CH₃CN anhidro (200 ml) bajo atmósfera de Ar, se adicionó sucesivamente HOBt (1.35 g, 10 mmol), BnNH₂ (1.06 ml, 10 mmol) y DIC (3.09 ml, 20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, el precipitado formado se filtró. El filtrado se disolvió en EtOAc (500 ml) y se lavó sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (2×50 ml), disolución saturada de NaHCO₃ (2×50 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml). Se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-2% de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose las bencilamidas N-Boc protegidas con rendimientos del 65%. Seguidamente, estas aminobencilamidas N-Boc protegidas (6.5 mmol) se disolvieron en disolución 3N de HCl en EtOAc (50 ml). Después de 30min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se obtuvieron cuantitativamente **75a,b** en forma de sólidos blancos amorfos.

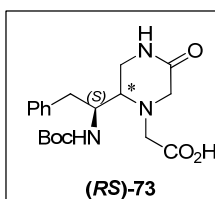


H-Orn(Z)-NHBn (75a)²³⁶. HPLC-MS [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% A en B, 5 min]: *t_R*= 2.92 min; ESI-MS, *m/z*: 356.3 [M+1]⁺.



H-Lys(Z)-NHBn (75b)²³⁷. HPLC-MS [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% A, 5 min]: *t_R*= 2.97; ESI-MS, *m/z*: 370.3 [M+1]⁺.

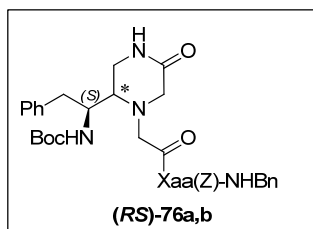
4.4.12.2. Síntesis de (5RS)-5-[(1S)-1-terc-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-4-(2-carboximetil)-2-oxopiperazina [(RS)-73]



Una disolución de la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas (**RS**)-**57** (500 mg, 1.07 mmol) en MeOH (50 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ durante 1 h en presencia de Pd (C) al 10% (50 mg). A continuación, el catalizador se filtró y se lavó con MeOH (5 ml). Los filtrados se evaporaron a vacío para obtener cuantitativamente la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas (**RS**)-**73** (sirupe, 404 mg, 100%) en proporción (3:1)

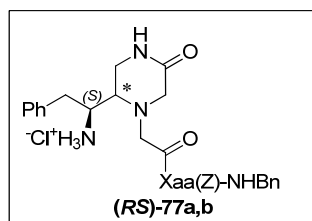
que no se pudo resolver. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas 2-oxopiperazinas se recogen en la Tabla 4.6 (Anexo III).

4.4.12.3. Síntesis de derivados de 2-oxopiperazinas pseudotripeptídicos (RS)-76a,b



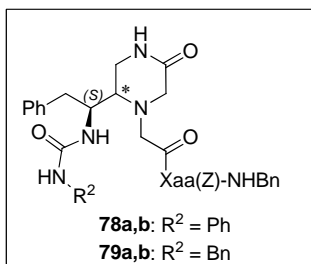
A una disolución de la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas **(RS)-73** (404 mg, 1.07 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (16 ml), se añadió sucesivamente HOBt (146 mg, 1.07 mmol), DIC (332 μl , 2.14 mmol) y una disolución de la bencilamida correspondiente **75a,b** (1.61 mmol) en DMF anhidro (4 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h y se eliminó el disolvente a sequedad. El residuo se disolvió en EtOAc (100 ml) y se lavó sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (2×10 ml), disolución saturada de NaHCO_3 (2×10 ml) y disolución saturada de NaCl (10 ml). La disolución se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-10% de MeOH en CH_2Cl_2 obteniendo las mezclas epiméricas **(RS)-76a,b**, como sirupos, con rendimientos del 60 y 66% respectivamente, que no se pudieron resolver. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-76a,b** se recogen en las Tablas 4.7 y 4.8 respectivamente (Anexo III).

4.4.12.4. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Boc. Síntesis de (RS)-77a,b



Las mezclas epiméricas de 2-oxopiperazinas **(RS)-76a,b** (0.60 mmol) se disolvieron en disolución 3 N de HCl en EtOAc (15 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H_2O (5 ml) y se liofilizó, obteniéndose cuantitativamente las 2-oxopiperazinas **(RS)-77a,b** como sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-77a,b** se recogen en las Tablas 4.7 y 4.8 respectivamente (Anexo III).

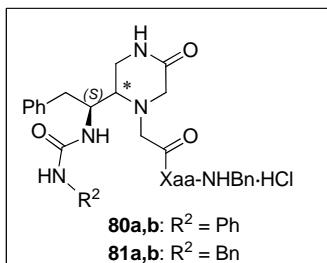
4.4.12.5. Síntesis de ureas derivadas de 2-oxopiperazinas 78a,b y 79a,b



A una disolución de **(RS)-77a,b** (0.60 mmol) en THF anhidro (30 ml), se añadió sucesivamente TEA (168 µl, 1.2 mmol) y el isocianato correspondiente (fenilo o bencilo) (1.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente.

A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml) y la disolución se lavó sucesivamente con H₂O (2×20 ml) y disolución saturada de NaCl (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-8% de MeOH en EtOAc. Los epímeros aislados se disolvieron en mezcla H₂O/CH₃CN (2:1) (2 ml) y se liofilizaron, obteniéndose las ureas **(R)-**, **(S)-78a,b** o **(R)-**, **(S)-79a,b** como sólidos amorfos, con rendimientos globales del 60-70%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos se recogen en las Tablas 4.7 y 4.9 respectivamente (Anexo III).

4.4.12.6. Procedimiento general de eliminación del grupo Z. Síntesis de 80a,b y 81a,b

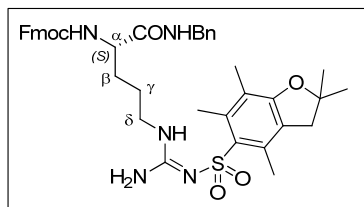


Una disolución de las ureas **(R)-**, **(S)-78a,b** o **-79a,b** (0.36 mmol) en MeOH (25 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente a 1 atm de presión de H₂ durante 1 h en presencia de Pd (C) al 10% (10% en peso) y disolución 3 N de HCl en EtOAc (240 µl, 0.72 mmol). A continuación, el catalizador se filtró y se lavó con MeOH (10 ml). Los filtrados se evaporaron a vacío y el

residuo se disolvió en mezcla H₂O/CH₃CN (2:1) (2 ml) y se liofilizaron para obtener cuantitativamente los clorhidratos de las ureas derivadas de 2-oxopiperazinas **(R)-** y **(S)-80a,b** o **-81a,b** con purezas superiores al 90% (HPLC) como sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **80a,b** y **81a,b** se recogen en las Tablas 4.7 y 4.10 respectivamente (Anexo III).

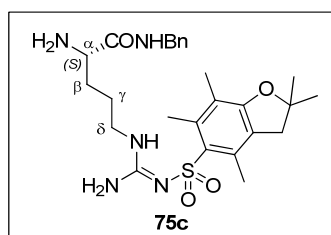
4.4.13. Síntesis de ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas

4.4.13.1. Formación de Fmoc-Arg(Pbf)-NHBn a partir de Fmoc-Arg(Pbf)-OH



Sobre una disolución de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (6.49 g, 10 mmol) en CH₃CN anhidro (200 ml) bajo atmósfera de Ar, se adicionó sucesivamente HOBt (1.35 g, 10 mmol), BnNH₂ (1.06 ml, 10 mmol) y DCC (4.13 g, 20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, el precipitado formado se filtró y se lavó varias veces con CH₃CN frío, obteniéndose de forma cuantitativa la bencilamida Fmoc-Arg(Pbf)-NHBn (7.38 g, 100%) en forma de sólido blanco. **[α]_D²⁰**: -1.2 (c 0.9, CHCl₃); **Pf**: 129-130 °C (Hexano); **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: *t_R* = 27.48 min; **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.14, 1.16 [2s, 6H, 2CH₃ (Pbf)], 1.50 (m, 2H, γ-H), 1.70 (m, 2H, β-H), 2.11, 2.50, 2.58 [3s, 9H, 3CH₃ (Pbf)], 2.96 [s, 2H, CH₂ (Pbf)], 3.30 (m, 2H, δ-H), 3.83 (dd, 1H, *J* = 6.5 y 13 Hz, α-H), 4.14 [t, 1H, *J* = 7 Hz, CH (Fmoc)], 4.46-4.51 [m, 4H, CH₂ (Bn) + CH₂ (Fmoc)], 5.71 (m, 1H, NH-Fmoc), 6.39 (m, 1H, NH-Pbf), 6.52 (m, 1H, NHBn), 7.11-7.83 [m, 13H, Ar (Fmoc + Bn)]; **¹³C-RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 12.9, 18.3, 19.7 [3CH₃ (Pbf)], 23.8 [2CH₃ (Pbf)], 25.8 [C_γ], 30.7 [C_β], 40.6 [C_δ], 42.6 [CH₂ (Bn)], 43.8 [CH₂ (Pbf)], 47.5 [CH (Fmoc)], 54.7 [C_α], 67.5 [CH₂ (Fmoc)], 86.8 [C (Pbf)], 117.9 [C (Pbf)], 120.4 [2CH (Fmoc)], 125.1 [C (Pbf)], 122.5, 127.5 [4CH (Fmoc)], 127.7, 128.0 [CH (Bn)], 128.1 [2CH (Fmoc)], 128.9 [CH (Bn)], 132.7 [C (Pbf)], 138.5 [C (Pbf)], 138.8 [C (Bn)], 141.6 [2C (Fmoc)], 144.1 [2C, Fmoc], 156.9 [CO (Fmoc)], 158.0 [Guanidino (Pbf)], 172.6 [CO]; **ESI-MS**, *m/z*: 738.6 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₄₁H₄₇N₅O₆S (%): C: 66.73, H: 6.42, N: 9.49. Encontrado (%): C: 66.86, H: 6.30, N: 9.40.

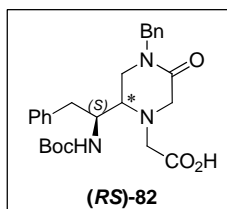
4.4.13.2. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Fmoc. Síntesis de H-Arg(Pbf)-NHBn (75c)



Sobre una disolución de la aminobencilamida Fmoc-Arg(Pbf)-NHBn (7.38 g, 10 mmol) en CH₃CN (200 ml), se adicionó Et₂NH (10.4 ml, 100 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, el precipitado formado se filtró, se lavó varias veces con CH₃CN frío y la disolución resultante se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó

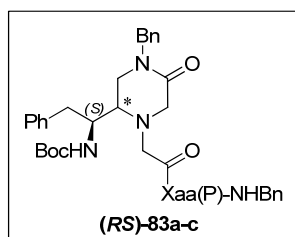
mediante cromatografía en columna flash, utilizando como eluyente gradiente del 0-20% de MeOH en EtOAc. Así, se obtuvo cuantitativamente H-Arg(Pbf)-NHBn (**75c**) (5.16 g, 100%) en forma de sólido blanco. $[\alpha]_D^{20}$: +7.4 (c 1, MeOH); **Pf**: 136-137 °C (CH₃CN); **HPLC** [Sunfire C₁₈, Gradiente 10-100% de A en B, 30 min]: t_R = 15.37 min; **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.12, 1.15 [2s, 6H, 2CH₃ (Pbf)], 1.07-1.31 (m, 2H, γ -H), 1.51-1.88 (m, 2H, β -H), 2.10, 2.50, 2.58 [3s, 9H, 3CH₃ (Pbf)], 2.95 [s, 2H, CH₃ (Pbf)], 3.06-3.56 (m, 2H, δ -H), 3.84 (dd, 1H, J = 6.5 y 13 Hz, α -H), 4.38 [s, 2H, CH₂ (Bn)], 6.44 (m, 1H, *NH*-Pbf), 7.09-7.42 (m, 5H, Ar), 7.93 (s, 1H, NHBn); **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.9, 18.4, 19.7 [3CH₃ (Pbf)], 23.9 [2CH₃ (Pbf)], 26.0 [C _{γ}], 32.4 [C _{β}], 40.9 [C _{δ}], 42.5 [CH₂ (Bn)], 43.6 [CH₂ (Pbf)], 54.7 [C _{α}], 86.8 [C (Pbf)], 117.9, 125.0 [2C (Pbf)], 127.7, 128.0, 129.0 [CH (Bn)], 132.6 [C (Pbf)], 133.4 [C (Pbf)], 138.7 [C (Bn)], 138.9 [C (Pbf)], 157.2 [Guanidino (Pbf)], 171.6 [CO]; **ESI-MS**, m/z : 516.4 (100%) [M+1]⁺; **Análisis elemental** calculado para C₂₆H₃₇N₅O₄S (%): C: 60.56, H: 7.23, N: 13.58. Encontrado (%): C: 60.41, H: 7.36, N: 13.63.

4.4.13.3. Síntesis de (5*RS*)-1-bencil-5-[(1*S*)-1-terc-butoxicarbonilamino-2-feniletíl]-4-(2-carboximetil)-2-oxopiperazina [(*RS*)-**82**]



Una disolución de las oxopiperazinas (**RS**)-**59** (500mg, 0.90 mmol) en MeOH (50 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H₂ durante 1 h en presencia de Pd (C) al 10% (50 mg). A continuación, el catalizador se filtró y se lavó con MeOH (10 ml). Los filtrados se evaporaron a vacío para obtener cuantitativamente la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas (**RS**)-**82** (sirupe, 421 mg, 100%) en proporción (3:1). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos se recogen en la tabla 4.6 (Anexo III).

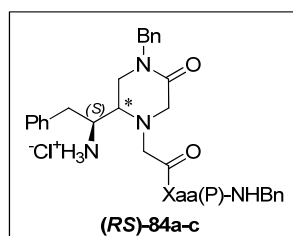
4.4.13.4. Síntesis de los derivados pseudotripeptídicos de 1-bencil-2-oxopiperazina (*RS*)-**83a-c**



A una disolución de la mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas (**RS**)-**82** (0.90 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (16 ml) se añadió sucesivamente HOBt (123 mg, 0.90 mmol), DIC (279 μ l, 0.18 mmol) y una disolución de la bencilamida correspondiente **75a-c** (1.35 mmol) en DMF anhidro (4 ml). La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó a sequedad. El residuo se disolvió

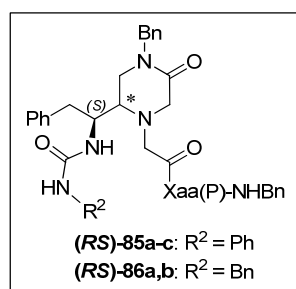
en EtOAc (100 ml) y la disolución se lavó sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (2×10 ml), disolución saturada de NaHCO₃ (2×10 ml) y disolución saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-10% de MeOH en CH₂Cl₂ obteniéndose las mezclas epiméricas **(RS)-83a-c** que no pudieron ser resueltas, con rendimientos entre el 65 y 78% en forma de sirupes. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-83a-c** se recogen en las Tablas 4.11 y 4.12 respectivamente (Anexo III).

4.4.13.5. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Boc. Síntesis de **(RS)-84a-c**



Las mezclas diastereoisoméricas **(RS)-83a-c** (0.50 mmol) fueron disueltas en disolución 3 N de HCl en EtOAc (15 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (5 ml) y la disolución se liofilizó, obteniéndose cuantitativamente las 2-oxopiperazinas **(RS)-84a-c** en forma de sólido amorfo. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-84a-c** se recogen en las Tablas 4.11 y 4.13 respectivamente (Anexo III).

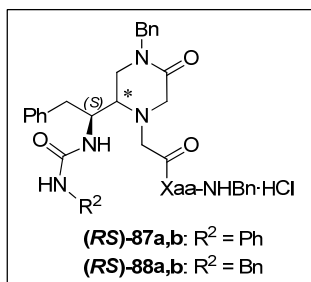
4.4.13.6. Síntesis de las ureas **(RS)-85a-c** y **(RS)-86a,b**



A una disolución de los derivados tripeptídicos **(RS)-84a-c** (0.50 mmol) en THF anhidro (30 ml), se añadió sucesivamente TEA (140 µl, 1 mmol) y el isocianato correspondiente (fenilo o bencilo) (1 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (80 ml) y la disolución se lavó sucesivamente con H₂O (2×15 ml) y disolución saturada de NaCl (15 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 0-10% de MeOH en EtOAc. Las mezclas epiméricas, que no se pudieron resolver, se disolvieron en mezcla H₂O/CH₃CN (2:1) (2 ml) y se liofilizaron, obteniéndose las ureas **(RS)-85a-c** o **(RS)-86a,b**

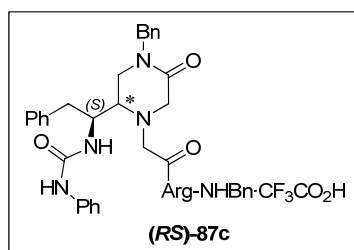
como sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-85a-c** y **(RS)-86a,b** se recogen en las Tablas 4.11 y 4.14 respectivamente (Anexo III).

4.4.13.7. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Z. Síntesis de **(RS)-87a,b** y **(RS)-88a,b**



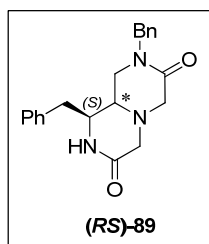
Una disolución de las ureas **(RS)-85a,b** o **(RS)-86a,b** (0.30 mmol) en MeOH (15 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente a 1 atm de presión de H_2 durante 1 h en presencia de Pd (C) al 10% (10% en peso) y disolución 3 N de HCl en EtOAc (200 μl , 0.6 mmol). A continuación, el catalizador se filtró y se lavó con MeOH (5 ml). Los filtrados se evaporaron y el residuo se disolvió en mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1) (2 ml) y se liofilizó, obteniéndose cuantitativamente los clorhidratos de las ureas derivadas de 2-oxopiperazinas **(RS)-87a,b** o **(RS)-88a,b** como sólidos amorfos con purezas superiores al 90% (HPLC). Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-87a,b** y **(RS)-88a,b** se recogen en las Tablas 4.11 y 4.15 respectivamente (Anexo III).

4.4.13.8. Procedimiento general de eliminación del grupo protector Pbf. Síntesis de **(RS)-87c**



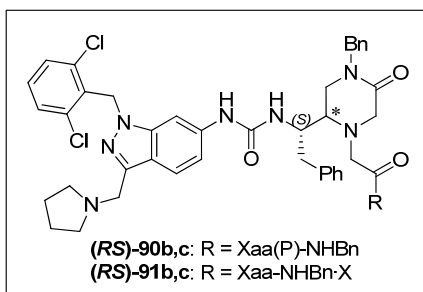
La mezcla epimérica de ureas derivadas de Arg(Pbf) **(RS)-85c** en proporción 3:1 (295 mg, 0.30 mmol) se disolvió en una mezcla TFA/ H_2O /TIS (90:5:5) (5 ml). Después de 5 h de agitación a temperatura ambiente, se eliminó el TFA por corriente de argón. El residuo se centrifugó en éter etílico (3 \times 10 ml) a -15°C durante 15 minutos a 5000 rpm, decantando el éter después de cada centrifugado. El residuo se disolvió en mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1) (2 ml) y se liofilizó, obteniéndose de forma cuantitativa los trifluoroacetatos de la mezcla epimérica de ureas desprotegidas **(RS)-87c** (254 mg, 100%) con purezas superiores al 90% (HPLC) en forma de sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-87c** se recogen en las Tablas 4.11 y 4.15 respectivamente (Anexo III).

4.4.13.9. Síntesis de (9aRS)-(1S)-1,8-bencil-3,7-dioxooctahidro-1H-pirazino[1,2-a]-pirazina [(RS)-89]



La mezcla epimérica de 2-oxopiperazinas **(RS)-59** (173 mg, 0.31 mmol) se disolvió en disolución 3N de HCl en EtOAc (5 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (2 ml) y la disolución se liofilizó. El liofilizado se disolvió en CH₃CN (5 ml) y a la disolución se añadió TEA (43 µl, 1.24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C utilizando MW como fuente de calefacción durante 40 min. Pasado este tiempo, el disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente gradiente 0-6% de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose la mezcla en proporción (3:1) de 3,7-dioxopirazinopirazinas **(RS)-89** (sirupe, 92 mg, 85%), que no se pudo resolver. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-89** se muestran en la Tabla 4.5 (Anexo III).

4.4.14. Síntesis de ureas análogas del antagonista de PAR1 de referencia RWJ-58259 **(RS)-90b,c** y **(RS)-91b,c**

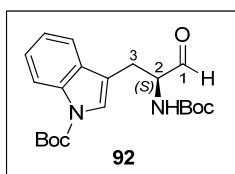


Sobre una disolución de trifosgeno (24 mg, 0.082 mmol) en THF (1 ml) se añadió lentamente durante 30 minutos, bajo atmósfera de argón, una disolución de 1-(2,6-diclorobencil)-6-amino-3-(pirrolidin-1-ilmetil)-1H-indazol **(36)** (83 mg, 0.22mmol) y óxido de propileno (19 µL, 0.27 mmol) en THF anhidro (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se añadió sobre el crudo de reacción una disolución de la mezcla de 2-oxopiperazinas **(RS)-84b,c** (0.22 mmol) y TEA (17 µL, 0.48mmol) en THF anhidro (5 ml). Tras 2 h de agitación a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (50 ml), se lavó sucesivamente con H₂O (2×10 ml) y disolución saturada de NaCl (10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en fase reversa utilizando como eluyente gradiente de CH₃CN en H₂O para dar las ureas derivadas de indazol **(RS)-90b,c** con rendimientos entre el 30 y 38%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-90b,c** se muestran en las Tablas 4.11 y 4.16 respectivamente (Anexo III). La eliminación del grupo protector

de la cadena lateral del aminoácido de estas ureas se llevó a cabo mediante los procedimientos generales de desprotección explicados en los apartados 4.4.13.7 y 4.4.13.8. de esta tesis, según fuesen compuestos derivados de Lys(Z) o Arg(Pbf). Las mezclas epiméricas de ureas desprotegidas **(RS)-91b,c** se obtuvieron de forma cuantitativa y con purezas superiores al 90%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **(RS)-91b,c** se muestran en las Tablas 4.11 y 4.16 respectivamente (Anexo III).

4.5. SÍNTESIS DE 2-OXOPIPERAZINAS DERIVADAS DE PSEUDODIPÉPTIDOS PORTADORES DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS

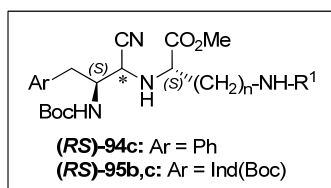
4.5.1. Producto de partida no comercial. Síntesis de *N,N'*-(di-*tert*-butoxicarbonil)-*L*-triptofanal [Boc-Trp(Boc)-H] (**92**)²³⁸



Sobre una disolución de Boc-Trp(Boc)-OH (5.20 g, 12.4 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (100 ml) se adicionó sucesivamente hidrocloreto de *N*-metoxi-*N*-metilamina (1.21 g, 12.4 mmol), dimetilaminopiridina (2.67 g, 22 mmol) y DCC (2.81 g, 13.6 mmol). Después de 12 h de agitación a temperatura ambiente, la dicitclohexilurea formada se separó de la mezcla de reacción por filtración. El filtrado obtenido se lavó sucesivamente con disolución 0.1 N de HCl (4×60 ml), H₂O (60 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente 20-55% de EtOAc en hexano, para dar la *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Trp(Boc)-OH en forma de sólido blanco amorfo (5.27 g, 95%). Seguidamente, sobre una suspensión de LiAlH₄ (0.90 g, 23.8 mmol) en THF anhidro (100 ml) enfriada a -78 °C y bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota una disolución de la *N*-metoxi-*N*-metilcarboxamida derivada de Boc-Trp(Boc)-OH (5.27 g, 11.9 mmol) en THF anhidro (100 ml). Después de 1 h de agitación a -78 °C, el exceso de hidruro se destruyó con disolución de KHSO₄ (2.58 g, 19.0 mmol) en H₂O (60 ml). A continuación, se añadió éter etílico (300 ml), y se mantuvo la agitación hasta que la mezcla adquirió temperatura ambiente. De este modo, se obtuvieron dos fases que fueron separadas. La fase acuosa se extrajo con éter etílico (2×125 ml) y los extractos orgánicos juntos se lavaron

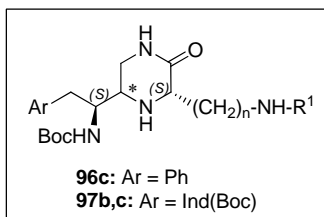
sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (100 ml), H₂O (100 ml) y disolución saturada de NaCl (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad, obteniendo el α -aminoaldehído **92** (4.35 g, 94%) como un sólido blanco. ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 1.39 (s, 3H, Boc), 1.67 [s, 1H, Boc (Indol)], 3.08 (dd, 1H, J = 9 y 15 Hz, 3-H), 3.31 (dd, 1H, J = 5 y 15 Hz, 3-H), 4.33 (ddd, 1H, J = 5, 7.5 y 9 Hz, 2-H), 6.51 (d, 1H, J = 7.5 Hz, NH -Boc), 7.25 [t, 1H, J = 7.5 Hz, 6-H (Indol)], 7.33 [t, 1H, J = 7.5 Hz, 7-H (Indol)], 7.54 [s, 1H, 2-H (Indol)], 7.64 [d, 1H, J = 7.5 Hz, 5-H (Indol)], 8.13 [d, 1H, J = 7.5 Hz, 8-H (Indol)], 9.71 (s, 1H, 1-H); ¹³C-RMN (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 24.6 [C₃], 28.3 [CH₃ (Boc indol)], 28.5 [CH₃ (Boc)], 60.5 [C₂], 79.6 [C (Boc)], 84.2 [C (Boc indol)], 115.9 [C₈ (Indol)], 117.3 [C₃ (Indol)], 119.7 [C₅ (Indol)], 123.2 [C₆ (Indol)], 124.9 [C₂ (Indol)], 125.1 [C₇ (Indol)], 131.6 [C₉ (Indol)], 136.3 [C₄ (Indol)], 150.2 [CO (Boc indol)], 156.6 [CO (Boc)], 200.9 [C₁].

4.5.2. Procedimiento general de síntesis de los pseudopéptidos Boc-XaaΨ [(*RS*)CH(CN)NH]Yaa-OMe (*RS*)-**94c** y -**95b,c**



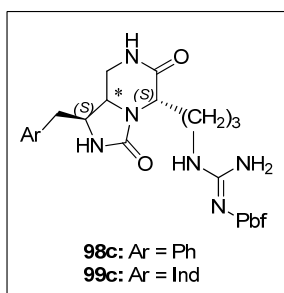
A una disolución de H-Lys(Boc)-OMe·HCl (**93b**) o H-Arg(Pbf)-OMe·HCl (**93c**) (7.96 mmol) en MeOH (40 ml) se añadió TEA (1.1 ml, 7.96 mmol). Después de 15 min de agitación a temperatura ambiente, la reacción se enfrió a -20 °C y se añadió ZnCl₂ (542 mg, 3.98 mmol) y el aldehído Boc-Xaa-H correspondiente [Xaa = Phe (**47**) o Trp(Boc) (**92**)] (3.98 mmol). Tras 1 h de agitación a esta temperatura, se añadió TMSCN (896 μ l, 7.16 mmol) y se agitó a 0 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en EtOAc (50 ml). La disolución se lavó sucesivamente con H₂O (2×25 ml) y disolución saturada de NaCl (25 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente de EtOAc en hexano para obtener las mezclas epiméricas (*RS*)-**94c** [(*R:S*) = (1:1)] o (*RS*)-**95b,c** [(*R:S*) = (2:1)], que no se pudieron resolver, en forma de sirupe con rendimientos entre el 72 y 95% respectivamente. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estas mezclas epiméricas están recogidos en la Tabla 4.17 (Anexo III).

4.5.3. Procedimiento general de síntesis de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c**



Una disolución de las mezclas epiméricas de α -aminonitrilos (**RS**)-**94c** o (**RS**)-**95b,c** (2.88 mmol) en MeOH (15 ml) se hidrogenó a temperatura ambiente y 1 atm de presión de H_2 , durante 12 h, en presencia de Ni Raney (1.50 g) como catalizador. Transcurrido este tiempo, se filtró el catalizador sobre celita y se lavó con MeOH (10 ml). Los filtrados se evaporaron a sequedad, y el residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente de MeOH en CH_2Cl_2 para dar las 2-oxopiperazinas(**R**)-, (**S**)-**96c** o -**97b,c**, como sólidos amarillentos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos están recogidos en la Tabla 4.18 (Anexo III).

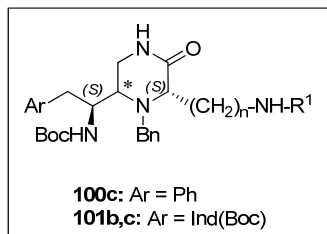
4.5.4. Procedimiento general de síntesis de las 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas **98c** y **99c**



Las 2-oxopiperazinas (**R**)-, (**S**)-**96c** o -**97c** (0.31 mmol) se disolvieron en disolución 3N de HCl en EtOAc (5 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en H_2O (2 ml) y se liofilizó. El liofilizado se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml) y a esta disolución se añadió TEA (87 μ l, 0.62 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 $^{\circ}C$, se añadió trifosgeno (36 mg, 0.12 mmol) y, a continuación, TEA (101 μ l, 0.73 mmol). Tras 2 h de agitación a 0 $^{\circ}C$, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 ml) y se lavó sucesivamente con H_2O (2 \times 5 ml) y disolución saturada de NaCl (5 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente de MeOH en CH_2Cl_2 para dar las 3,6-dioxooctahidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas (**R**)-, (**S**)-**98c** o -**99c**, en forma de sirupes, con rendimientos entre el 50% y 60%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **98c** y **99c** están recogidos en la Tabla 4.19 (Anexo III).

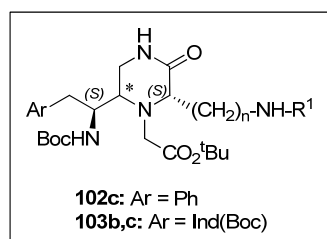
4.5.5. Procedimiento general de *N*-alquilación en posición *N*₄

4.5.5.1. Síntesis de 2-oxopiperazinas benciladas en posición *N*₄ **100c** y **101b,c**



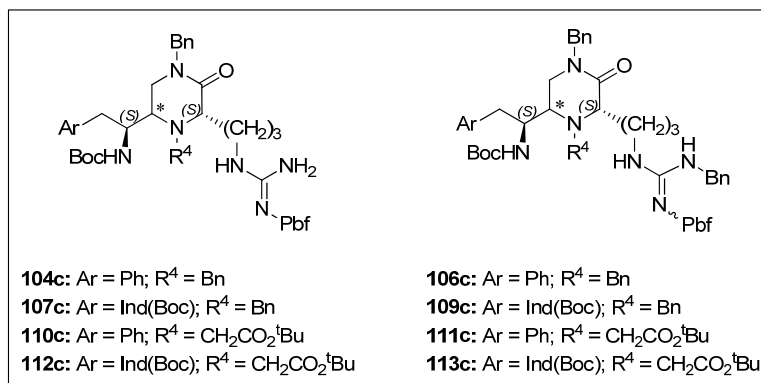
A una disolución de las 2-oxopiperazinas (**R**)-, (**S**)-**96c** o -**97b,c** (0.66 mmol) en CH₃CN anhidro (10 ml) se añadió, bajo atmósfera de argón y en agitación a 60 °C, bromuro de bencilo (541 µl, 2.71 mmol) y DIEA (456 µl, 2.71 mmol), repartidos en cuatro porciones durante 72 h (una porción cada 24 h). Después de 24 h desde la última adición, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ (200 ml), la disolución se lavó sucesivamente con agua (50 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose las 2-oxopiperazinas benciladas en posición 4 (**R**)-, (**S**)-**100c** o -**101b,c**, con rendimientos entre el 50 y 80%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **100c** y **101b,c** se recogen en la Tabla 4.20 (Anexo III).

4.5.5.2. Síntesis de 2-oxopiperazinas portadoras del grupo *tert*-butoxicarbonilmetilo en posición *N*₄ **102c** y **103b,c**

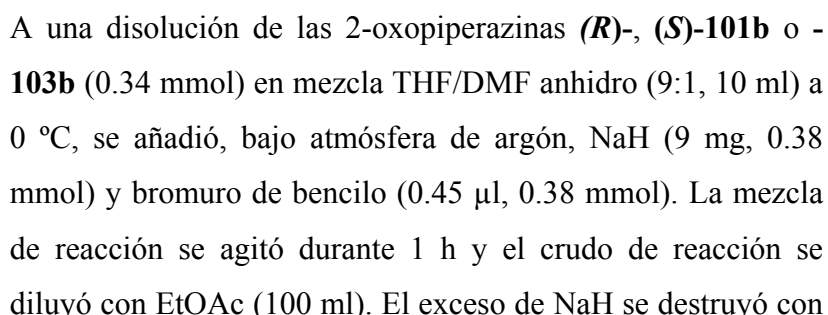


A una disolución de las 2-oxopiperazinas (**R**)-, (**S**)-**96c** o -**97b,c** (0.66 mmol) en CH₃CN anhidro (10 ml) se añadió, bajo atmósfera de argón y en agitación a 60 °C, bromuro de bencilo (672 µl, 3.37 mmol) y DIEA (566 µl, 3.37 mmol), repartidos en cuatro porciones durante 96 h (una porción cada 24 h). Después de 24 h desde la última adición, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ (200 ml), la disolución se lavó sucesivamente con agua (50 ml) y disolución saturada de NaCl (50 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose las 2-oxopiperazinas benciladas en posición 4 (**R**)-, (**S**)-**102c** o -**103b,c**, con rendimientos entre el 50 y 80%. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de **102c** y **103b,c** se recogen en la Tabla 4.21 (Anexo III).

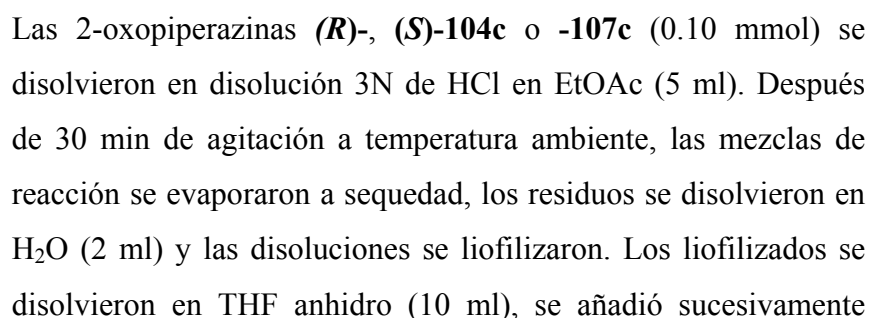
4.5.6. Procedimiento general de *N*-alquilación con BnBr en posición N₁ y grupo guanidino de las 2-oxopiperazinas derivadas de Arg(Pbf) 100c-103c. Síntesis de 104c, 106c, 107c, 109c y 110c-113c



A una disolución de las 2-oxopiperazinas (*R*)-, (*S*)-100c-103c (0.34 mmol) en mezcla THF/DMF anhidro (9:1, 10 ml) en agitación a 0 °C, se añadió, bajo atmósfera de argón, bromuro de bencilo (152 µl, 0.51 mmol) y NaH (24 mg, 1.02 mmol), repartidos en tres porciones durante 2 h (una porción cada 1 h). Después de 1 h desde la última adición, el crudo de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml). El exceso de NaH se destruyó con H₂O (20 ml) y se obtuvieron dos fases que fueron separadas. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2×50 ml) y los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, utilizando como eluyente gradiente de MeOH en CH₂Cl₂, obteniendo las 2-oxopiperazinas monoalquiladas en posición N₁ (*R*)-, (*S*)-104c, -107c, -110c o -112c, con rendimientos entre el 40 y 57%, y las mezclas de isómeros *Z/E* de 2-oxopiperazinas bencil dialquiladas en posición 1 y en el grupo guanidino (*R*)-, (*S*)-106c, -109c, -111c o -113c, con rendimientos entre el 11 y 20%. Los compuestos se disolvieron en mezcla H₂O/CH₃CN (2:1) (2 ml) y se liofilizaron, obteniéndose estos compuestos como sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos se recogen en las Tablas 4.22-4.25 (Anexo III).



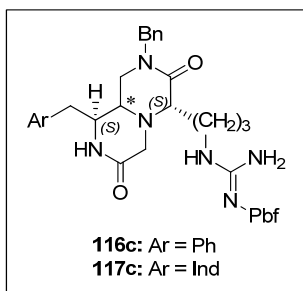
4.5.8. Procedimiento general de síntesis de bencilureas derivadas de 1,4-bencil-2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de Arg 114c y 115c



172

mezcla H₂O/CH₃CN (2:1) (2 ml) y se liofilizaron, obteniéndose estos compuestos como sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las ureas **114c** y **115c** se recogen en la Tabla 4.26 (Anexo III).

4.5.9. Procedimiento general de síntesis de las 8-bencil-3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas **116c** y **117c**



Las 2-oxopiperazinas (**R**)-, (**S**)-**110c** o **112c** (0.10 mmol) se disolvieron en disolución 3N de HCl en EtOAc (5 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, las mezclas de reacción se evaporaron a sequedad, los residuos se disolvieron en H₂O (2 ml) y las disoluciones se liofilizaron. Los liofilizados se disolvieron en CH₃CN (5 ml) y a las disoluciones se añadió TEA (56 µl, 0.40 mmol). Las mezclas de reacción se agitaron a 100 °C utilizando MW como fuente de calefacción durante 40 min. Pasado este tiempo, el disolvente se evaporó a sequedad y los residuos se purificaron por cromatografía radial utilizando como eluyente gradiente de MeOH en CH₂Cl₂, obteniéndose las 3,7-dioxooctahidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas (**R**)- y (**S**)-**116** o -**117** con rendimientos entre el 60 y 96%. Los compuestos obtenidos se disolvieron en mezcla H₂O/CH₃CN (2:1) (2 ml) y se liofilizaron, obteniéndose estos compuestos como sólidos amorfos. Los datos analíticos y espectroscópicos más significativos de estos compuestos se recogen en la Tabla 4.27 (Anexo III).

4.6. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

4.6.1. Ensayo de inhibición de agregación plaquetaria

La sangre necesaria para el ensayo fue obtenida de personas voluntarias (30 mL por persona), las cuales no habían tomado ningún fármaco que alterara las plaquetas durante las dos semanas previas a la donación. La sangre se extrae por punción venosa y se recoge en tubos Vacutainer de 2.7 ml que contienen una solución tampón al 3.2% de citrato de sodio. La sangre extraída fue centrifugada a $250\times g$ durante 7 minutos para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). Después de separar PRP, el resto de la sangre fue recentrifugada a $900\times g$ durante 10 min para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El PPP fue usado como referencia óptica en la agregación y como diluyente para obtener un PRP de una concentración final de 200000 plaquetas/ μL . La agregación plaquetaria se midió en un agregómetro óptico (Chrono-Log modelo 440 de cuatro canales). Se prepararon por duplicado las siguientes muestras en cubetas de vidrio:

- Muestra control: 0.5 ml de PRP con 30 μM de SFLLRN.
- Muestra a ensayar: 0.5 ml de PRP con 30 μM de SFLLRN y 0.1 mg/ml del compuesto a evaluar. (Todas las disoluciones se realizaron en DMSO).

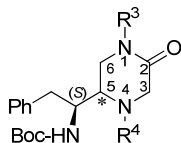
Las muestras fueron incubadas 5 min a 37 °C. Se realizó la medida de la agregación plaquetaria al comienzo y al final del ensayo, siendo el valor máximo de agregación plaquetaria el determinado en la muestra control al final del ensayo. Por comparación de este valor máximo con el valor obtenido por las muestras a ensayar, se determinó el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria. El resultado obtenido es la media de los dos ensayos realizados.

4.6.2. Evaluación de la actividad antitumoral. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad se realizó en multiplaca de 96 pocillos, utilizando el método del NCI (National Cancer Institute)²³⁹. El crecimiento celular se evaluó tras 48 h de incubación en presencia o ausencia de los compuestos a ensayar. El resultado expresa el porcentaje de crecimiento con respecto al control sin tratar. Puesto que se toma como referencia el tiempo cero, momento en que empieza el tratamiento, se puede observar crecimiento (igual a control (100%) = “no efecto” o inferior al control (100 a 0%) = “citostaticidad”) o muerte celular (parcial (0 a -99%) o total (-100%) = “citotoxicidad”). En el ensayo se determinan tres valores críticos, a saber: GI₅₀, concentración que produce una inhibición del crecimiento del 50%; TGI, concentración que produce una inhibición total del crecimiento; LC₅₀, concentración que produce un 50% de muerte celular. El ensayo de citotoxicidad se realizó en las líneas celulares A-549 (pulmón) y Ht-29 (colon). La cuantificación del ensayo se realizó por colorimetría mediante tinción con sulforodamina B (SRB) y medición de la densidad óptica en el lector de multicapa tipo ELISA. Estos ensayos fueron realizados por la empresa farmacéutica PharmaMar.

4.7. ANEXO III: TABLAS DE DATOS ANALÍTICOS Y ESPECTROSCÓPICOS

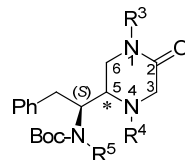
Tabla 4.1. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas **57-59**^a.



	<i>(RS)</i> -57		<i>(RS)</i> -58		<i>(RS)</i> -59	
R ³	H		CH ₂ CO ₂ Bn		Bn	
R ⁴	CH ₂ CO ₂ Bn		CH ₂ CO ₂ Bn		CH ₂ CO ₂ Bn	
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₂₆ H ₃₃ N ₃ O ₅		C ₃₅ H ₄₁ N ₃ O ₆		C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₅	
M. Molecular	467.6		616.2		557.7	
ESI-MS [M+1] ⁺	468.4		617.5		558.2	
Rendimiento (%)	90		17		65	
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^c	21.41		27.3		26.61	
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^d	4.56		-		5.50	
¹ H-RMN ^e						
3-H	3.44, 3.66	3.44, 3.64	3.60, 3.69	3.60, 3.69	3.40, 3.61	-
5-H	2.94	2.97	2.85	2.85	2.95	-
6-H	3.35, 3.45	3.28, 3.45	3.38, 3.48	3.38, 3.48	3.19, 3.31	3.17, 3.33
5-CH	4.02	3.91	3.94	3.94	3.97	3.75
5-CH-CH ₂	2.94	2.86, 2.97	2.85	2.85	2.74	-
NH-Boc	4.45	5.02	4.43	4.43	4.25	4.26
Boc	1.34	1.36	1.34	1.34	1.32	1.34
Ph	7.10-7.41	7.10-7.41	7.31-7.40	7.31-7.40	7.10-7.40	7.10-7.40
<i>J</i> _{5-CH,NH}	8	8	8	8	9	9
R ^{3 f}	6.29	6.25	3.47, 5.19	3.47, 5.19	4.45, 4.73	4.41, 4.63
R ⁴						
4-CH ₂	3.50	3.50	3.47	3.47	3.57	-
CH ₂ (Bn)	5.16	5.14	5.19	5.19	5.13	5.15
¹³ C-RMN ^g						
			-	-		
C ₂	169.4	-	-	-	167.2	168.3
C ₃	52.8	52.4	-	-	52.8	52.8
C ₅	58.0	58.0	-	-	57.9	58.2
C ₆	40.7	40.7	-	-	44.6	45.2
C ₅ -CH	51.4	-	-	-	51.2	51.2
C ₅ -CH-CH ₂	37.6	38.4	-	-	37.6	37.6
Boc	28.2, 79.8	28.3, 79.8	-	-	28.2, 79.8	28.2, 79.8
	155.4	155.4	-	-	155.2	155.2
Ph	137.2	137.4	-	-	137.2	137.2
R ³			-	-	49.7, 136.4	49.8, 136.4
R ⁴			-	-		
CH ₂ -CO ₂	53.9, 170.2	54.1, 170.4	-	-	54.4, 170.2	-, 170.3
Bn	66.7, 135.3	66.7, 135.3	-	-	66.8, 135.4	66.7, 134.4

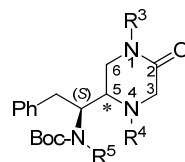
^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupos y como mezclas epiméricas en proporción (R):(S) = (3:1). ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 5 min. ^eEspectros registrados a 400 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^fLas señales correspondientes a CH aromático no están incluidas. ^gEspectros registrados a 100 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromático no están incluidas. El espectro de **(RS)-58** no fue registrado. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas.

Tabla 4.2. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas **60** y **62-64**^a.



	(RS)-60		(RS)-62		(RS)-63		(RS)-64	
R ³	H		Boc		Boc		H	
R ⁴	CONHBn		H		H		CO ₂ Bn	
R ⁵	H		H		Boc		H	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
(R:S)	(3:1)		(5:2)		(2:1)		(3:1)	
F. Molecular ^b	C ₂₅ H ₃₂ N ₃ O ₄		C ₂₂ H ₃₃ N ₃ O ₅		C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₇		C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₅	
M. Molecular	452.2		420.3		520.3		453.5	
ESI-MS [M+1] ⁺	453.5		420.6		520.5		454.7	
Rendimiento (%)	86		55		30		90	
t _R (min) (A:B) ^c	18.49	18.89	15.64	15.17	28.63	29.00	20.89	
¹ H-RMN ^d								
3-H	3.56, 4.08	3.90, 4.08	3.60, 3.69	3.49, 3.64	3.97, 4.09	3.90, 4.09	3.57, 4.08	3.60, 4.12
5-H	4.55	4.55	2.98	2.96	3.70	3.70	4.20	4.22
6-H	3.45	3.18, 3.58	3.41, 3.94	3.41, 3.94	3.77	3.77	3.22, 3.26	3.20, 3.25
5-CH	4.09	4.09	3.90	3.90	4.09	4.11	3.87	3.87
5-CH-CH ₂	2.82	2.75, 2.95	2.88, 2.97	2.87, 2.95	2.57, 2.66	2.56, 2.67	2.58	2.62
Boc	1.29	1.30	1.36	1.36	1.29	1.29	1.23	1.23
Ph	7.11-7.33	7.11-7.33	7.11-7.33	7.11-7.33	7.10-7.26	7.10-7.26	7.05-7.27 7.27-7.46	7.05-7.27 7.27-7.46
J _{3-H,3-H}	17.5	17	17	18	18	-	18	-
R ³	6.66	6.55	1.52	1.52	1.43	1.43	7.98	7.98
R ^{4 e}	4.42, 5.28	4.42, 5.36	-	-	-	-	5.11	5.11
R ⁵	4.92	4.90	4.48	4.75	1.39	1.39	6.98	6.60
J _{5-CH,NH}	9	-	9	9	-	-	9	9

Tabla 4.2. Continuación.



	(<i>RS</i>)-60		(<i>RS</i>)-62		(<i>RS</i>)-63		(<i>RS</i>)-64	
¹³ C-RMN ^f								
C ₂	166.4	166.4	166.4	-	-	-	166.4	166.6
C ₃	45.1	45.1	45.1	-	-	-	45.1	45.1
C ₅	51.0	51.0	51.0	-	-	-	52.4	52.6
C ₆	57.6	57.6	57.6	-	-	-	40.5	40.5
C ₅ -CH	51.2	51.2	51.2	-	-	-	50.4	50.4
C ₅ -CH-CH ₂	37.6	37.6	37.8	-	-	-	37.8	37.8
Boc	28.2, 79.8, 156.0	28.2, 79.6, 157.2	27.9, 79.9, 151.9	-	-	-	28.8, 77.8, 155.6	28.8, 77.8, 155.6
Ph	137.7	137.0	137.0	-	-	-	136.8	136.9
R ³	-	-	28.2, 83.6, 151.9	-	-	-	-	-
R ⁴	45.1, 139.0	45.1, 138.9	-	-	-	-	67.3, 154.7	67.8, 154.9
R ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-

^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^dEspectros registrados a 400 MHz en CDCl₃, excepto para (*RS*)-62 y (*RS*)-63 que fueron registrado en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^eLas señales correspondientes a CH aromático no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en CDCl₃, excepto para (*RS*)-62 y (*RS*)-63 que fueron registrado en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. El espectro de (*RS*)-63 no fue registrado. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. Las señales correspondientes a CH aromático no están incluidas.

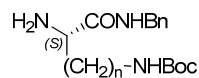
Tabla 4.3. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las α -aminoamidas **70a,b**.

$$\begin{array}{c} \text{FmocHN} \text{---} \text{C}^{\text{(S)}} \text{---} \text{CONHBn} \\ | \\ (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{NHBoc} \end{array}$$

	70a	70b
n	3	4
F. Molecular ^a	C ₃₂ H ₃₇ N ₃ O ₅	C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₅
M. Molecular	543.3	557.3
ESI-MS [M+1] ⁺	544.4	558.4
Rendimiento (%)	100	100
Punto de Fusión (°C) ^b	180-181	155-156
[α] _D	-3.1 (c 1, CHCl ₃)	-2.6 (c 1.1, CHCl ₃)
t _R (min) (A:B) ^c	26.00	26.38
¹ H-RMN ^d		
α -H	4.37	4.38
β -H	1.69	1.60
γ -H	1.12	1.34
δ -H	3.05	1.80
ϵ -H	-	3.08
NH-R	4.68	4.61
R	1.40	1.41
NH-Fmoc	5.71	5.54
	4.20, 4.38, 5.71	4.17, 4.37, 5.71
Fmoc	7.30, 7.40, 7.59	7.30, 7.39, 7.56
	7.75	7.75
CH ₂ (Bn)	4.42	4.43
NH-Bn	6.93	6.52
J _{NH,H} (Bn)	5.5	5.5
J _{α-H, β-H}	8.5	-
¹³ C-RMN ^e		
C _{α}	53.3	54.9
C _{β}	30.5	29.6
C _{γ}	26.6	22.5
C _{δ}	38.8	32.0
C _{ϵ}	-	39.8
R	28.3, 79.4, 156.8	28.4, 79.3, 156.3
	47.2, 66.9, 120.0	47.2, 67.0, 119.9
Fmoc	125.2, 127.1, 128.7	125.1, 127.0, 127.7
	141.3, 143.8, 156.4	141.2, 143.7, 156.2
CH ₂ (Bn)	43.5	43.5
CONH	171.9	171.5

^aAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^bCompuestos recristalizados en hexano:EtOAc. ^cHPLC (Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^dEspectros registrados a 300MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^eEspectros registrados a 75 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

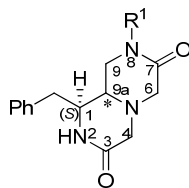
Tabla 4.4. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las α -aminoamidas **71a,b**.



	71a	71b
n	3	4
F. Molecular ^a	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₃	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₃
M. Molecular	321.2	335.2
ESI-MS [M+1] ⁺	322.4	336.3
Rendimiento (%)	100	100
Punto de Fusión (°C) ^b	96-97	112-113
[α] _D	+8.9 (c 1.2, MeOH)	+6.8 (c 1.1, MeOH)
t _R (min) (A:B) ^c	12.76	12.89
¹ H-RMN ^d		
α -H	3.15	3.13
β -H	1.05-1.79	1.32-1.44
γ -H	1.05-1.79	1.32-1.44
δ -H	2.89	1.32-1.44
ϵ -H	-	2.87
NH-R	6.80	6.73
R	1.39	1.30
NH ₂	1.89	3.31
CH ₂ (Bn)	4.25	4.27
NH-Bn	8.41	8.31
J _{NH,H} (Bn)	6	6
J _{α-H, β-H}	6.5	6.5, 9
¹³ C-RMN ^e		
C _{α}	54.9	55.1
C _{β}	32.9	29.8
C _{γ}	26.5	23.0
C _{δ}	40.7	23.6
C _{ϵ}		35.2
R	28.6, 77.6, 155.9	28.6, 77.6, 155.9
CH ₂ (Bn)	42.2	42.4
CONH	175.6	175.5

^aAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^bCompuestos recristalizados en diclorometano. ^cHPLC (Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^dEspectros registrados a 300MHz en DMSO-*d*₆, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^eEspectros registrados a 75 MHz en DMSO-*d*₆, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC.

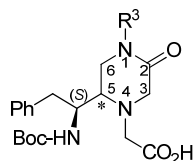
Tabla 4.5. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 3,7-dioxopirazino-[1,2-*a*]pirazinas **67** y **89**.^a



	(RS)-67		(RS)-89	
R ¹	H		Bn	
Conf. C _{9a}	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular ^b	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂		C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₂	
M. Molecular	259.3		349.1	
ESI-MS [M+1] ⁺	260.2		350.0	
Rendimiento (%)	80		85	
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^c	9.08	9.28	15.46	15.69
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^d	2.69		3.77	
¹ H-RMN ^e				
1-H	4.08	3.56	3.99	3.48
2-H	6.08	6.08	5.70	5.74
4-H	3.43, 3.46	3.16, 3.46	3.40	3.11,3.36
6-H	3.23, 3.23	3.12, 3.46	3.41, 3.65	3.23, 3.57
9-H	3.37, 3.75	3.36, 3.48	3.16, 3.59	3.32
9a-H	3.31	2.83	3.37	2.81
1-CH ₂	2.60, 2.76	2.69, 2.99	2.48, 2.70	2.54, 2.81
Ph	7.16-7.21	7.16-7.21	6.99-7.12	6.99-7.12
	7.27-7.41	7.27-7.41	7.19-7.46	7.19-7.46
<i>J</i> _{1,9a}	4.5	-	4.5	-
<i>J</i> _{9,9a}	4.5 y 13	-	5 y 14	-
R ^{1f}	6.87	6.94	4.51, 4.80	4.54, 4.70
¹³ C-RMN ^g				
C ₁	54.3	54.7	54.4	54.4
C ₃	168.2	167.6	167.9	167.4
C ₄	51.5	55.5	51.6	55.8
C ₆	55.5	54.8	55.9	54.9
C ₇	168.7	-	165.6	166.5
C ₉	36.5	42.7	40.6	47.5
C _{9a}	51.7	54.4	52.6	55.6
C ₁ -CH ₂	37.7	40.3	37.7	40.2
Ph	135.2	135.3	135.1	135.0
R ¹	-	-	50.1, 136.0	49.5, 135.9

^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupos y como mezclas epiméricas en proporción (R):(S) = (3:1). ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 5 min. ^eEspectros registrados a 400 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^fLas señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas. ^gEspectros registrados a 100 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas.

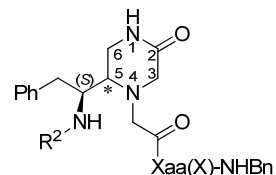
Tabla 4.6. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas **73** y **82**^a.



	(RS)-73		(RS)-82	
R ³	H		Bn	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular ^b	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₅		C ₂₆ H ₃₃ N ₃ O ₅	
M. Molecular	377.4		467.6	
ESI-MS [M+1] ⁺	378.0		468.2	
Rendimiento (%)	100		100	
t _R (min) (A:B) ^c	13.99	13.39	19.72	19.00
t _R (min) (A:B) ^d	3.55	3.43	4.53	4.51
¹ H-RMN ^e				
3-H	3.30, 3.47	3.31, 3.42	3.49, 3.62	3.63, 3.38
5-H	2.88	2.92	2.87	2.97
6-H	3.19	3.19	3.23, 3.33	-
4-CH ₂	3.47	3.47	3.49, 3.38)	3.23, 3.49
5-CH	3.80	3.80	4.00	3.82
5-CH-CH ₂	2.56, 2.97	2.47, 2.82	2.73	-
NH-Boc	6.80	6.89	4.30	-
Boc	1.24	1.25	1.35	1.35
Ph	7.02-7.36	7.02-7.36	6.93-7.40	6.93-7.40
J _{5-CH,NH}	9.5	9	9	-
R ^{3f}	7.76	7.75	4.52, 4.68	4.57, 4.82
¹³ C-RMN ^g				
C ₂	168.3	169.2	167.8	-
C ₃	54.0	53.1	54.1	54.1
C ₅	58.4	59.0	58.7	58.7
C ₆	38.9	38.8	44.1	-
4-(CH ₂ -CO ₂)	53.3, 172.6	54.1, 172.4	54.4, 172.2	54.4, -
C ₅ -CH	51.8	52.0	51.6	-
C ₅ -CH-CH ₂	37.9	35.7	37.5	-
Boc	28.6, 78.1, 155.8	28.6, 78.0, 155.5	28.2, 80.2, 155.7	28.2, 80.2, 155.7
Ph	139.6	139.8	136.8	136.8
R ³	-	-	49.7, 136.2	49.6, 136.2

^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupos y como mezclas epiméricas en proporción (R):(S) = (3:1). ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 5 min. ^eEspectros registrados a 500 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^fLas señales correspondientes a CH aromático no están incluidas. ^gEspectros registrados a 125 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas.

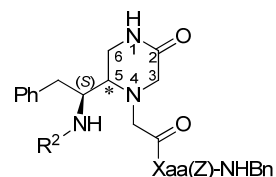
Tabla 4.7. Datos analíticos más significativos de los derivados pseudotripeptídicos de 2-oxopiperazinas **76a,b-81a,b**.



	R ²	Xaa(X)	Conf. C ₅ (R:S)	F. Molecular ^b	M. Molecular	ESI-MS [M+1] ^c	Rendimiento (%)	[α] _D	t _R (min) ^d	t _R (min) ^e
(RS)-76a	Boc	Orn(Z)	(3:1)	C ₃₉ H ₅₀ N ₆ O ₇	714.9	715.6	60	-	21.07	4.74
(RS)-76b	Boc	Lys(Z)	(3:1)	C ₄₀ H ₅₂ N ₆ O ₇	728.9	729.3	66	-	21.56 (R) 21.41 (S)	4.78
(RS)-77a	H·HCl	Orn(Z)	(3:1)	C ₃₄ H ₄₁ N ₆ O ₅ ·HCl	651.2	615.8	100	-	14.86	-
(RS)-77b	H·HCl	Lys(Z)	(3:1)	C ₃₅ H ₄₃ N ₆ O ₅ ·HCl	665.2	629.7	100	-	15.25	-
(R)-79a	CONHPh	Orn(Z)	(R)	C ₄₁ H ₄₇ N ₇ O ₆	733.9	734.4	46	-0.1 (c 1, MeOH)	20.30	4.62
(S)-79a	CONHPh	Orn(Z)	(S)	C ₄₁ H ₄₇ N ₇ O ₆	733.9	734.5	18	+9.2 (c 1.5, MeOH)	21.41	4.78
(R)-79b	CONHPh	Lys(Z)	(R)	C ₄₂ H ₄₉ N ₇ O ₆	747.9	748.6	46	-3.7 (c 1.5, MeOH)	20.64	4.68
(S)-79b	CONHPh	Lys(Z)	(S)	C ₄₂ H ₄₉ N ₇ O ₆	747.9	748.7	15	+6.7 (c 0.9, MeOH)	21.76	4.77
(R)-80a	CONHBn	Orn(Z)	(R)	C ₄₂ H ₄₉ N ₇ O ₆	747.9	748.6	38	-3.8 (c 1.2, MeOH)	20.79	4.66
(S)-80a	CONHBn	Orn(Z)	(S)	C ₄₂ H ₄₉ N ₇ O ₆	747.9	748.4	17	-8.2 (c 1, MeOH)	20.09	4.59
(R)-80b	CONHBn	Lys(Z)	(R)	C ₄₃ H ₅₁ N ₇ O ₆	761.9	763.2	36	-5.6 (c 0.8, MeOH)	21.05	4.72
(S)-80b	CONHBn	Lys(Z)	(S)	C ₄₃ H ₅₁ N ₇ O ₆	761.9	763.3	13	-11 (c 0.9, MeOH)	20.47	4.65
(R)-81a	CONHPh	Orn(H·HCl)	(R)	C ₃₃ H ₄₁ N ₇ O ₄ ·HCl	636.2	600.5	100	1.7 (c 0.7, MeOH)	14.65	3.03
(S)-81a	CONHPh	Orn(H·HCl)	(S)	C ₃₃ H ₄₁ N ₇ O ₄ ·HCl	636.2	600.5	100	-1.6 (c 1.1, MeOH)	15.07	3.06
(R)-81b	CONHPh	Lys(H·HCl)	(R)	C ₃₄ H ₄₃ N ₇ O ₄ ·HCl	650.2	614.5	100	-3.0 (c 1.7, MeOH)	14.97	3.07
(S)-81b	CONHPh	Lys(H·HCl)	(S)	C ₃₄ H ₄₃ N ₇ O ₄ ·HCl	650.2	614.5	100	+4.2 (c 0.4, MeOH)	15.21	3.05
(R)-82a	CONHBn	Orn(H·HCl)	(R)	C ₃₄ H ₄₃ N ₇ O ₄ ·HCl	650.2	614.5	100	-7.9 (c 1.3, MeOH)	14.67	3.03
(S)-82a	CONHBn	Orn(H·HCl)	(S)	C ₃₄ H ₄₃ N ₇ O ₄ ·HCl	650.2	614.5	100	-3.2 (c 1.2, MeOH)	15.01	3.06
(R)-82b	CONHBn	Lys(H·HCl)	(R)	C ₃₅ H ₄₅ N ₇ O ₄ ·HCl	664.2	628.5	100	-4.3 (c 0.6, MeOH)	14.80	3.06
(S)-82b	CONHBn	Lys(H·HCl)	(S)	C ₃₅ H ₄₅ N ₇ O ₄ ·HCl	664.2	628.5	100	-1.6 (c 1.1, MeOH)	15.34	3.09

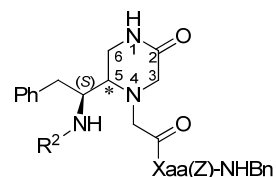
^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos, excepto **(RS)-76ab** que fueron aislados como sirupos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cPara los clorhidratos, la masa observada es la correspondiente al ión molecular de la amina libre. ^dHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^eHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 5 min.

Tabla 4.8. Datos espectroscópicos más significativos de los derivados pseudotripeptídicos de 2-oxopiperazinas **76a,b** y **77a,b**.



	(RS)-76a		(RS)-76b		(RS)-77a		(RS)-77b	
R ²	Boc		Boc		H·HCl		H·HCl	
Xaa	Orn		Lys		Orn		Lys	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H-RMN ^a								
1-H	6.38	6.62	6.85	6.77	7.63	-	7.63	-
3-H	3.36, 3.44	3.32, 3.46	3.20, 3.35	3.10, 3.36	3.02, 3.52	-	3.02, 3.54	3.01, 3.55-
5-H	2.86	-	2.78	2.78	2.86(-	2.88	-
6-H	3.36	-	3.23	3.23	2.95	-	3.01	-
4-CH ₂	3.30, 3.34	3.26, 3.38	3.22	3.15	3.23, 3.33	-	3.23, 3.37	3.37, 3.38
5-CH	4.04	3.94	4.00	3.90	4.16	-	4.18	-
5-CH-CH ₂	2.82, 3.02	-	2.77, 2.95	-	2.59, 2.86	-	2.59, 2.84	-
5-CH-NH	4.70	-	4.81	-	8.03	-	8.07	-
Ph	7.11-7.39	7.11-7.39	7.08-7.40	7.08-7.40	7.15-7.40	7.15-7.40	7.14-7.41	7.14-7.41
R ²	1.31	1.31	1.27	1.27	-	-	-	-
Xaa(Z)								
α-NH	7.79	-	7.79	7.73	8.14	8.20	8.15	8.23
α-H	4.70	-	4.48	4.46	4.28	4.32	4.26	4.26
β-H	1.67, 1.84	1.64, 1.86	1.65, 1.83	1.65, 1.83	1.57, 1.72	1.57, 1.72	1.66	1.66
γ-H	1.52	-	1.29	1.29	1.30	1.30	1.22	1.22
δ-H	3.12, 3.42	-	1.44	1.44	2.95	-	1.35	1.35
ε-H	-	-	3.05	-	-	-	2.94	-
NH	5.12	5.01-5.08	5.25	-	7.26	-	7.24	7.24
CH ₂ -(Z)	4.83, 4.93	4.82, 4.95	5.03	5.03	4.97	4.98	4.98	4.98
NH-Bn	7.20	7.20	7.37	7.37	8.51	8.57	8.55	8.58
CH ₂ (Bn)	4.34, 4.42	4.35, 4.47	4.34, 4.40	4.28, 4.42	4.40	4.40	4.24	4.24

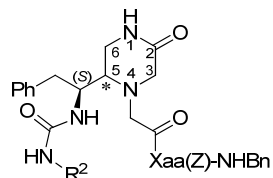
Tabla 4.8. Continuación



	(<i>RS</i>)-76a		(<i>RS</i>)-76b		(<i>RS</i>)-77a		(<i>RS</i>)-77b	
¹³ C-RMN ^b								
C ₂	168.9	-	169.4	169.4	168.2	-	168.2	-
C ₃	54.0	-	53.9	53.9	49.7	-	49.6	49.6
C ₅	58.8	-	58.7	59.0	55.9	-	55.9	-
C ₆	39.4	-	39.5	39.4	34.9	-	34.8	-
4-(CH ₂ -CO)	55.7, 169.7	-	55.7, 169.8	55.7, 170.3	58.5, 169.7	-	58.5, 169.6	58.5, 169.6
C ₅ -CH	51.3	-	51.6	51.9	50.2	-	51.6	-
C ₅ -CH-CH ₂	37.6	-	37.6	-	36.0	-	36.0	-
R ²	28.2, 79.9	28.2, 79.9	28.1, 79.6	28.1, 79.7	-	-	-	-
Ph	136.4	136.4	136.6	136.6,	136.6		136.6	
Xaa(Z)								
C _α	51.5	-	52.7	52.7	52.4	52.3	52.8	52.8
C _β	30.3	-	32.1	31.8	28.8	28.8	31.2	31.2
C _γ	26.3	-	22.6	22.6	26.1	26.0	22.9	22.9
C _δ	39.7	-	29.2	29.6	40.5	-	29.0	29.0
C _ε	-	-	40.5	-	-	-	39.5	-
CO	171.5	171.5	171.5	171.6	171.6	-	171.7	-
Z	66.6, 137.0	66.6, 137.0	66.4, 137.1	66.4, 137.1	65.1, 137.2	65.1, 137.2	65.1, 137.3	65.1, 137.3
	157.1	157.1	156.5	156.5	156.1	156.1	156.1	156.1
Bn	43.5, 138.0	43.5, 138.0	43.4, 138.0	43.4, 138.0	42.0, 139.4	42.0, 139.4	42.0, 139.4	42.0, 139.4

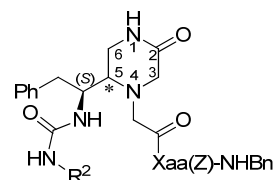
^aEspectros registrados a 400 MHz en CDCl₃ para (*RS*)-76a,b y en DMSO-d₆ para (*RS*)-77a,b, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^bEspectros registrados a 100 MHz en CDCl₃ para (*RS*)-76a,b y en DMSO-d₆ para (*RS*)-77a,b, asignados con la ayuda de HSQC y HMBC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas

Tabla 4.9. Datos espectroscópicos más significativos de las ureas pseudotripeptídicas **78a,b** y **79a,b**.



	(R)-78a	(S)-78a	(R)-78b	(S)-78b	(R)-79a	(S)-79a	(R)-79b	(S)-79b
R ²	Ph	Ph	Ph	Ph	Bn	Bn	Bn	Bn
Xaa	Orn	Orn	Lys	Lys	Orn	Orn	Lys	Lys
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H-RMN ^a								
1-H	5.97	5.67	6.23	5.81	5.90	7.09	5.77	7.03
3-H	3.14, 3.35	3.14, 3.54	3.16, 3.38	3.18, 3.62	3.09, 3.50	3.16, 3.40	3.12, 3.53	3.18, 3.40
5-H	2.84	3.08	2.92	2.98	3.00	2.98	3.01	3.02
6-H	3.37, 4.20	3.10, 3.95	3.20, 4.25	3.10, 4.05	3.15, 3.85	3.42, 3.51	3.16, 3.86	3.55
4-CH ₂	3.03, 3.44	3.32	3.03, 3.44	3.30, 3.42	3.25	3.35	3.22, 3.28	3.37
5-CH	4.25	3.92	4.28	3.95	3.94	4.38	3.94	4.40
5-CH-CH ₂	2.82, 2.88	2.54, 2.90	2.80, 2.87	2.58, 2.87	2.57, 2.86	2.80, 3.06	2.54, 2.86	2.82, 3.05
5-CH-NH	6.12	5.94	5.98	5.69	5.75	5.89	5.66	5.98
CONH	7.65	7.93	7.64	7.98	6.07	6.00	6.04	6.04
Ph	6.91-7.35	6.83-7.35	6.78-7.59	7.12-7.14	7.08-7.39	7.07-7.35	7.09-7.41	7.08-7.41
CH ₂ (R ²)	-	-	-	-	4.27, 4.36	4.16, 4.27	4.27, 4.37	4.15, 4.25
J _{5-CH, CH2}	-	4, 11	-	-, 12.5	3.5, 11	4, 10	2.5, 11	-
Xaa(Z)								
α-NH	7.88	7.97	7.90	8.09	7.99	8.14	7.97	8.15
α-H	4.62	4.62	4.50	4.50	4.66	4.56	4.43	4.51
β-H	1.50, 1.70	1.53, 1.72	1.50, 1.73	1.67, 1.82	1.55, 1.70	1.71, 1.87	1.59, 1.75	1.68, 1.83
γ-H	1.30	1.32, 1.40	1.30	1.23	1.40	1.55	1.25	1.56
δ-H	2.83, 3.24	2.92, 3.35	1.40	1.18, 1.35	3.04, 3.32	3.12	1.42	1.30
ε-H	-	-	2.85, 3.20	2.92-3.20	-	-	3.04, 3.10	3.18
NH	5.25	4.95	5.27	5.02	5.30	6.46	5.24(6.45
CH ₂ (Z)	4.60	4.60, 4.83	5.01	4.98	4.79, 4.89	5.00	5.00	5.00
NH-Bn	7.46	7.53	7.48	6.94	7.50	8.03	7.30	8.04
CH ₂ (Bn)	4.26, 4.36	4.28, 4.44	4.30, 4.38	4.35, 4.50	4.17, 4.23	4.33	4.24	4.28

Tabla 4.9. Continuación.

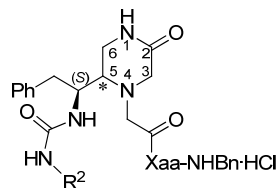


¹³ C-RMN ^b	(<i>R</i>)-78a	(<i>S</i>)-78a	(<i>R</i>)-78b	(<i>S</i>)-78b	(<i>R</i>)-79a	(<i>S</i>)-79a	(<i>R</i>)-79b	(<i>S</i>)-79b
C ₂	168.7	168.8	170.5	168.6	168.9	170.7	168.6	169.0
C ₃	54.9	51.9	51.7	52.0	51.8	55.9	51.7	54.4
C ₅	59.6	58.6	59.8	58.7	58.3	62.5	58.5	61.0
C ₆	40.1	35.8	38.3	35.7	35.8	40.9	35.9	39.2
4-(CH ₂ -CO)	57.8, 169.4	57.7, 169.2	59.2, 170.5	57.8, 169.7	57.5, 170.0	59.6, 171.5	57.7, 169.9	57.6, 169.7
C ₅ -CH	51.6	52.3	53.9	52.0	52.5	53.5	52.4	52.0
C ₅ -CH-CH ₂	37.9	37.8	39.6	37.7	37.5	39.4	37.5	37.9
NHCONH	-	157.6	156.9	156.7	158.5	159.8	158.5	158.3
Ph	134.3	135.6	136.8	135.6	135.8	140.5	135.8	138.9
R ²	139.5	139.6	139.2	139.5	44.4, 139.6	44.8, 142.3	44.2, 139.6	43.2, 140.7
Xaa(Z)								
C _α	52.0	50.8	54.8	52.8	51.0	54.1	52.6	52.6
C _β	29.9	31.1	31.9	32.6	30.6	31.5	32.5	29.9
C _γ	26.7	26.4	23.1	22.2	26.1	27.8	22.4	26.2
C _δ	39.7	38.9	29.3	29.1	39.3	41.6	29.2	29.7
C _ε	-	-	40.7	40.2	-	-	40.4	39.9
CO	-	172.9	172.6	172.4	172.2	173.5	172.0	171.9
Z	67.0, 136.1	66.7, 136.2	66.8, 137.5	66.5, 136.5	66.5, 136.2	67.1, 139.2	66.6, 136.5	65.5, 137.5
	157.2	155.6	156.1	155.6	157.2	158.1	156.7	156.5
Bn	43.7, 137.9	43.8, 137.3	43.6, 138.2	43.8, 137.1	43.5, 137.5	44.1, 140.9	43.6, 137.4	42.5, 139.4

^aEspectros registrados a 400 MHz en CDCl₃, excepto para (*S*)-78a y (*S*)-79b que fueron registrados a 500 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC.

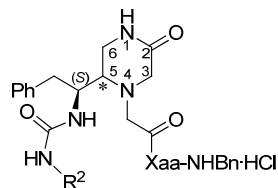
^bEspectros registrados a 100 MHz en CDCl₃, excepto para (*S*)-78a y (*S*)-79b que fueron registrados a 125 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.10. Datos espectroscópicos más significativos de las ureas pseudotripeptídicas desprotegidas **80a,b** y **81a,b**.



	(R)-80a	(S)-80a	(R)-80b	(S)-80b	(R)-81a	(S)-81a	(R)-81b	(S)-81b
R ²	Ph	Ph	Ph	Ph	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	CH ₂ Ph
Xaa	Orn	Orn	Lys	Lys	Orn	Orn	Lys	Lys
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H-RMN ^a								
1-H	7.86	7.81	7.88	7.69	7.92	7.90	7.82	7.84
3-H	3.38, 3.55	3.40, 3.65	3.38, 3.54	3.33, 3.63	3.20-3.86	3.40, 3.65	3.37, 3.60	3.38, 3.62
5-H	2.63	2.83	2.84	2.90	2.60-3.16	2.52-2.97	2.80	2.90
6-H	3.05, 3.40	3.00, 3.42	3.00, 3.42	2.74, 3.29	2.88	2.52-2.97	3.02, 3.40	2.57-3.01
4-CH ₂	3.40, 3.50	3.35, 3.50	3.40, 3.50	3.13, 3.42	3.20-3.86	3.24-3.69	3.25, 3.40	3.42, 3.53
5-CH	4.05	4.04	4.23	4.10	4.04	4.03	3.98	4.20
5-CH-CH ₂	2.62, 2.73	2.79, 2.89	2.61, 2.95	2.72, 2.89	2.60-3.16	2.60, 2.93	2.75, 2.82	2.62, 2.90
5-CH-NH	8.58	6.70	-	6.55	6.53	6.48	6.35	6.45
CONH	8.74	8.92	8.90	8.70	6.74	6.96-7.36	6.59	6.96-7.34
Ph	6.80-7.35	6.79-7.49	6.80-7.37	6.80-7.40	7.18-7.33	6.96-7.36	7.08-7.35	6.96-7.34
CH ₂ (R ²)	-	-	-	-	4.20	4.05, 4.20	4.20	4.00, 4.17
Xaa								
α-NH	8.23	8.21	8.17	7.92	8.34	8.30	8.08	8.05
α-H	4.39	4.31	4.32	4.20	4.34	4.39	4.24	4.30
β-H	1.63, 1.80	1.58, 1.74	1.58, 1.70	1.55, 1.73	1.56, 1.78	1.60, 1.80	1.57, 1.69	1.47, 1.70
γ-H	1.58	1.48	1.27	1.29	1.56	1.58	1.21	1.28
δ-H	2.75	2.62	1.52	1.50	2.72	2.56	1.49	1.50
ε-H	-	-	2.72, 2.92	2.80	-	-	2.68	2.65
NH ₂ ·HCl	7.86	7.81	7.88	7.69	7.92	7.90	7.82	7.84
NH-Bn	8.65	8.65	8.61	6.56	8.70	8.70	8.57	8.60
CH ₂ (Bn)	4.24, 4.31	4.25	4.22, 4.31	4.18, 4.35	4.26	4.25	4.25	4.26
J _{NH, CH₂} (NHBn)	-	6	6	6	6	-	6	-

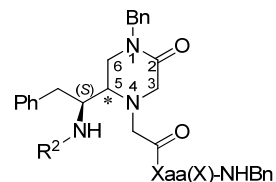
Tabla 4.10. Continuación.



	(<i>R</i>)-80a	(<i>S</i>)-80a	(<i>R</i>)-80b	(<i>S</i>)-80b	(<i>R</i>)-81a	(<i>S</i>)-81a	(<i>R</i>)-81b	(<i>S</i>)-81b
¹³ C-RMN ^b								
NHCONH	155.1	155.3	158.7	158.5	155.2	-	158.0	159.0
Ph	137.6	137.5	137.5	138.0	138.1	138.2	137.3	137.4
R ²	140.2	140.3	43.4, 141.0	43.1, 141.0	140.0	140.2	42.9, 140.7	42.6, 141.0
Xaa								
C _α	51.5	51.5	52.0	52.1	51.2	51.6	52.0	52.5
C _β	29.2	28.9	29.5	29.6	30.7	30.7	31.4	31.6
C _γ	23.5	23.4	23.8	23.9	22.2	22.1	22.1	22.2
C _δ	38.2	38.1	39.5	38.7	26.5	26.8	26.5	26.5
C _ε	-	-	-	-	38.4	38.5	38.5	38.5
CO	171.0	170.9	171.4	171.3	171.0	171.2	171.2	171.5
Bn	42.0, 139.1	42.0, 139.1	42.5, 139.6	42.5, 139.6	42.0, 139.2	42.0, 139.4	42.0, 139.3	42.0, 139.6

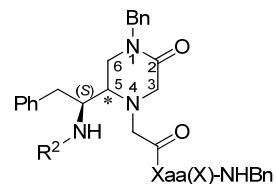
^aEspectros registrados a 500 MHz en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^bEspectros registrados a 125 MHz en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Los carbonos del anillo de 2-oxopiperazina, así como los adyacentes, no se observaron en la mayoría de los casos por problemas de relajación. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas

Tabla 4.11. Datos analíticos más significativos de los derivados pseudotripeptídicos de 1-bencil-2-oxopiperazinas **83-85a-c**, **86a,b**, **87a-c**, **88a,b** y **90-91b,c^a**.



	R ²	Xaa(X)	Conf. C ₅ (R:S)	F. Molecular ^b	M. Molecular	ESI-MS [M+1] ^c	Rendimiento (%)	t_R (min) ^d		t_R (min) ^e	
								(R)	(S)	(R)	(S)
(RS)-83a	Boc	Orn(Z)	(3:1)	C ₄₆ H ₅₆ N ₆ O ₇	805.0	806.6	65	25.24		5.45	
(RS)-83b	Boc	Lys(Z)	(3:1)	C ₄₇ H ₅₈ N ₆ O ₇	819.0	819.7	78	25.42		5.49	
(RS)-83c	Boc	Arg(Pbf)	(3:1)	C ₅₂ H ₆₈ N ₈ O ₈ S	965.2	966.8	73	26.88		5.67	
(RS)-84a	H·HCl	Orn(Z)	(3:1)	C ₄₁ H ₄₈ N ₆ O ₅ ·HCl	741.3	706.5	100	16.76		-	
(RS)-84b	H·HCl	Lys(Z)	(3:1)	C ₄₂ H ₅₀ N ₆ O ₅ ·HCl	755.4	720.8	100	16.93		-	
(RS)-84c	H·HCl	Arg(Pbf)	(3:1)	C ₄₇ H ₆₀ N ₈ O ₆ S·HCl	901.6	866.0	100	18.40	19.68	-	
(RS)-85a	CONHPh	Orn(Z)	(3:1)	C ₄₈ H ₅₃ N ₇ O ₆	824.0	825.7	70	23.73	24.44	2.47	2.81
(RS)-85b	CONHPh	Lys(Z)	(3:1)	C ₄₉ H ₅₉ N ₇ O ₆	838.0	839.7	65	24.06		2.61	
(RS)-85c	CONHPh	Arg(Pbf)	(3:1)	C ₅₄ H ₆₅ N ₉ O ₇ S	984.2	985.1	75	25.80	26.74	3.28	3.69
(RS)-86a	CONHBn	Orn(Z)	(3:1)	C ₄₉ H ₅₉ N ₇ O ₆	838.0	839.6	65	23.30	23.82	2.40	2.63
(RS)-86b	CONHBn	Lys(Z)	(3:1)	C ₅₀ H ₅₇ N ₇ O ₆	852.0	853.7	62	23.69	24.16	2.54	2.74

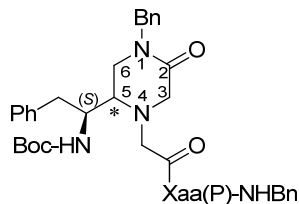
Tabla 4.11. Continuación



	R ²	Xaa(X)	C ₅ Conf. (R:S)	F. Molecular ^b	M. Molecular	ESI-MS [M+1] ^c	Rendimiento (%)	<i>t_R</i> (min) ^d		<i>t_R</i> (min) ^e	
								(R)	(S)	(R)	(S)
(RS)-87a	CONHPh	Orn(H·HCl)	(3:1)	C ₄₀ H ₄₇ N ₇ O ₄ ·HCl	726.3	690.6	100	16.27	16.52	3.42	
(RS)-87b	CONHPh	Lys(H·HCl)	(3:1)	C ₄₁ H ₄₉ N ₇ O ₄ ·HCl	740.3	705.6	100	16.44		3.41	
(RS)-87c	CONHPh	Arg(H·CF ₃ CO ₂ H)	(3:1)	C ₄₁ H ₄₉ N ₉ O ₄ ·CF ₃ CO ₂ H	845.9	732.7	100	16.60	16.87	3.47	
(RS)-88a	CONHBn	Orn(H·HCl)	(3:1)	C ₄₁ H ₄₉ N ₇ O ₄ ·HCl	740.3	705.6	100	16.32	16.78	3.42	
(RS)-88b	CONHBn	Lys(H·HCl)	(3:1)	C ₄₂ H ₅₁ N ₇ O ₄ ·HCl	754.4	719.9	100	15.83	16.25	3.40	
(RS)-90a	Indz	Lys(Z)	(3:1)	C ₆₂ H ₆₈ Cl ₂ N ₁₀ O ₆	1120.0	1120.9	30	19.99		3.84	
(RS)-90b	Indz	Arg(Pbf)	(3:1)	C ₆₇ H ₇₈ Cl ₂ N ₁₂ O ₇ S	1266.4	1267.1	38	20.38	21.40	4.00	4.08
(RS)-91a	Indz (HCl)	Lys(H·HCl)	(3:1)	C ₅₄ H ₆₂ Cl ₂ N ₁₀ O ₄ ·2HCl	1054.3	493.6 [(M+2)/2] ⁺	100	14.99		3.11	
(RS)-91b	Indz (CF ₃ CO ₂ H)	Arg(H·CF ₃ CO ₂ H)	(3:1)	C ₅₄ H ₆₂ Cl ₂ N ₁₂ O ₄ ·CF ₃ CO ₂ H	1128.1	507.5 [(M+2)/2] ⁺	100	15.14	15.72	3.25	

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos, excepto **(RS)-83a-c** que fueron aislados como sirupos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cPara los clorhidratos, la masa es la correspondiente al ión molecular de la amina libre. ^dHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min. ^eHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 5 min.

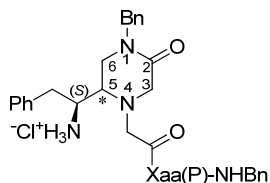
Tabla 4.12. Datos espectroscópicos más significativos de los derivados pseudotripeptídicos de 1-bencil-2-oxopiperazinas **83a-c**.



	(RS)-83a		(RS)-83b		(RS)-83c	
Xaa(P)	Orn(Z)		Lys(Z)		Arg(Pbf)	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H-RMN ^a						
3-H	3.35, 3.55	-	3.35, 3.50	3.38, 3.54	3.32, 3.49	-
5-H	2.86	-	2.78	-	2.82	-
6-H	3.08, 3.30	3.08, 3.30	3.19, 3.25	-	3.24, 3.30	3.20, 3.35
1-CH ₂ (Bn)	4.81, 4.92	-	4.39, 4.75	4.72, 4.79	4.38, 4.76	4.70, 4.86
4-CH ₂	3.44	-	3.20, 3.37	3.12, 3.39	3.24	-
5-CH	4.00	3.85	3.95	3.82	3.95	3.83
5-CH-CH ₂	2.76, 2.83	2.56, 2.74	2.69, 2.82	-	2.73, 2.84	2.73, 2.84
NH-Boc	4.7	4.64	4.29	4.33	4.50	-
Ph	7.02-7.46	7.02-7.46	7.01-7.38	7.01-7.38	6.81-7.24	6.81-7.24
Xaa(P)						
α-NH	7.74	7.70	7.67	7.55	7.87	7.83
α-H	4.42	4.42	4.44	4.43	4.57	4.57
β-H	1.67, 1.86	1.67, 1.86	1.65, 1.86	1.65, 1.86	1.67, 1.90	1.67, 1.90
γ-H	1.43	-	1.31	-	1.53	-
δ-H	3.23	-	1.47	-	3.24	-
ε-H	-	-	3.12	-	-	-
NH δ						
NHC(NH ₂)=N	5.06	5.08	5.04	5.04	6.41	6.41
NH-Bn	6.70	6.70	6.74	6.96	7.60	7.62
CH ₂ (Bn)	4.34, 4.44	4.34, 4.44	4.42, 4.45	4.42, 4.45	4.31, 4.41	4.31, 4.41
¹³ C-RMN ^b						
C ₂	167.9	-	166.9	-	167.3	-
C ₃	54.2	-	54.4	54.4	54.4	-
C ₅	58.5	-	59.4	-	59.4	-
C ₆	44.5	44.5	43.6	43.6	44.0	44.0
1-Bn	49.0, 136.2	-	49.8, 136.2	49.6, 136.2	49.8, 138.2	49.6, 138.2
4-(CH ₂ -CO)	56.7, 169.7	-	56.1, 169.6	56.1, 169.6	56.5, 169.9	-
C ₅ -CH	51.5	51.5	51.7	51.7	51.7	51.7
C ₅ -CH-CH ₂	37.6	37.6	37.7	-	37.6	37.6
Ph	136.6	136.6	136.6	136.6	136.9	136.9
Xaa(P)						
C _α	52.0	52.0	52.7	-	52.2	52.2
C _β	31.9	31.6	31.9	31.6	31.0	30.9
C _γ	26.4	-	22.7	-	25.4	-
C _δ	40.5	-	29.4	-	40.4	-
C _ε	-	-	40.5	-	-	-
NHC(NH ₂)=N	-	-	-	-	156.3	156.3
CO	171.2	171.2	171.2	171.2	171.3	171.3
Bn	43.7, 138.0	43.7, 138.0	43.6, 138.0	43.6, 138.0	43.4, 138.2	43.3, 138.2

^aEspectros registrados a 500 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^bEspectros registrados a 125 MHz en CDCl₃ asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas.

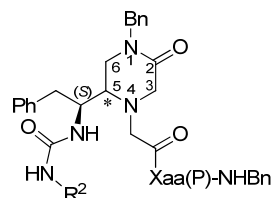
Tabla 4.13. Datos espectroscópicos más significativos de los derivados pseudotripeptídicos de 1-bencil-2-oxopiperazinas **84a-c**.



	(RS)-84a		(RS)-84b		(RS)-84c	
Xaa(P)	Orn(Z)		Lys(Z)		Arg(Pbf)	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H-RMN ^a						
3-H	3.21, 3.56	3.45, 3.56	3.20, 3.53	-	3.19, 3.55	-
5-H	2.98	3.15	2.96	3.15	2.95	3.15
6-H	3.46	3.46	3.38, 3.46	3.38, 3.46	3.39, 3.44	3.39, 3.44
1-CH ₂ (Bn)	4.45, 4.62	4.28, 4.38	4.45, 4.63	4.28, 4.40	4.45, 4.63	4.30, 4.40
4-CH ₂	3.30	-	3.24, 3.29	-	3.29	-
5-CH	3.70	3.60	3.72	3.55	3.65	3.55
5-CH-CH ₂	2.85, 2.90	-	2.83, 2.96	-	2.83, 2.94	-
NH ₂ -HCl	8.11	8.11	8.19	8.19	8.18	8.18
Ph	7.17-7.37	7.17-7.37	7.16-7.37	7.16-7.37	6.91-7.37	6.91-7.37
Xaa(P)						
α-NH	8.19	8.43	8.13-8.26	8.43	8.23	8.46
α-H	4.30	4.30	4.28	4.28	4.30	4.30
β-H	1.57, 1.70	1.57, 1.70	1.58, 1.70	1.58, 1.70	1.56, 1.70	1.56, 1.70
γ-H	1.40, 1.47	1.40, 1.47	1.22, 1.27	1.22, 1.27	1.44	1.44
δ-H	2.98	-	1.41	-	3.02	-
ε-H	-	-	2.94	-	-	-
NH ó NHC(NH ₂)=N	7.25	7.25	7.20	7.20	6.45	6.45
J _{NHα, α-H}	8	8	-	8	8	8
NH-Bn	8.54	8.52	8.57	8.57	8.59	8.56
CH ₂ (Bn)	4.28	4.28	4.26	4.26	4.23	4.23
¹³ C-RMN ^b						
C ₂	167.1	-	167.5	-	167.6	167.5
C ₃	54.7	54.7	55.0	55.0	55.0	55.0
C ₅	57.3	58.6	57.7	59.1	57.8	59.1
C ₆	43.5	43.4	44.0	43.8	44.0	43.9
1-CH ₂ Ph	48.8, 137.0	48.9, 136.9	49.2, 137.4	49.3, 137.3	49.2, 137.4	49.1, 137.4
4-(CH ₂ -CO)	56.1, 169.4	-	56.6, 169.8	-	56.7, 169.9	-
C ₅ -CH	51.7	51.3	52.1	51.7	52.1	51.8
C ₅ -CH-CH ₂	34.6	34.6	35.0	35.0	35.0	35.0
Ph	135.8,	135.9,	136.2,	136.3,	136.2,	136.3,
Xaa(P)						
C _α	52.3	52.5	53.1	53.3	52.8	53.0
C _β	29.5	29.3	32.0	31.9	29.9	29.9
C _γ	26.0	26.2	23.2	23.3	26.1	26.1
C _δ	40.5	-	29.5	-	40.3	40.3
C _ε	-	-	41.1	-	-	-
NHC(NH ₂)=N	-	-	-	-	156.5	156.5
CO	171.4	171.4	172.0	172.0	171.8	171.8
Bn	42.0, 139.2	42.0, 139.2	42.4, 139.8	42.4, 139.2	42.4, 139.7	42.4, 139.7

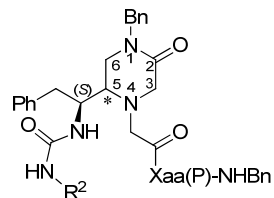
^aEspectros registrados a 500 MHz en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^bEspectros registrados a 125 MHz en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas.

Tabla 4.14. Datos espectroscópicos más significativos de las ureas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas pseudotripeptídicas **85a-c** y **86a,b**.



	(<i>RS</i>)-85a		(<i>RS</i>)-85b		(<i>RS</i>)-85c		(<i>RS</i>)-86a		(<i>RS</i>)-86b	
R ²	Ph		Ph		Ph		Bn		Bn	
Xaa(P)	Orn(Z)		Lys(Z)		Arg(Pbf)		Orn(Z)		Lys(Z)	
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
¹ H-RMN ^e										
3-H	3.20, 3.49	-	3.15, 3.53	-	3.06, 3.64	-	3.32, 3.55	3.38, 3.57	3.12, 3.41	-
5-H	2.94	-	2.89	2.94	2.64	2.64	2.90	-	2.76	2.76
6-H	3.20, 3.38	3.08, 3.39	3.25	3.25	3.28, 3.58	3.28, 3.58	3.23, 3.36	3.04, 3.34	3.12, 3.24	2.98, 3.18
1-CH ₂ (Bn)	4.32, 4.82	4.50	4.25, 4.77	4.52, 4.58	4.13, 5.00	4.46, 4.59	4.32, 4.79	4.50, 4.79	4.32, 4.62	4.43, 4.52
4-CH ₂	3.35, 3.40	3.35, 3.40	3.31	-	2.94, 3.50	-	3.20, 3.32	-	3.24, 3.12	3.22, 3.10
5-CH	4.07	4.07	4.20	4.20	4.30	4.30	4.18	4.02	3.93	3.76
5-CH-CH ₂	2.69, 2.88	2.81, 2.94	2.68, 2.82	2.78, 2.89	2.68, 2.77	2.68, 2.77	2.69, 2.88	2.57, 2.85	2.64	2.68
5-CH-NH	5.57	5.39	5.45	5.65	5.98	5.98	5.08	5.08	4.92	-
CONH	6.84-7.30	6.84-7.30	6.84-7.52	6.84-7.52	6.86-7.37	6.86-7.37	5.95	-	5.70	-
Ph	6.84-7.30	6.84-7.30	6.84-7.52	6.84-7.52	6.86-7.37	6.86-7.37	6.95-7.40	6.95-7.40	6.81-7.33	6.81-7.33
CH ₂ (R ²)	-	-	-	-	-	-	4.08, 4.15	-	3.95, 4.04	-
Xaa(P)										
α-NH	7.79	7.73	7.79	7.89	7.88	7.78	7.86	7.78	7.71	7.64
α-H	4.78	4.72	4.44	4.44	4.32	4.29	4.68	4.68	4.38	4.34
β-H	1.70, 1.80	1.70, 1.80	1.67, 1.85	-	1.52, 1.68	-	1.65, 1.82	1.63, 1.80	1.60, 1.78	-
γ-H	1.50	1.40	1.33	-	1.40	-	1.52	1.46	1.27	-
δ-H	3.10, 3.42	3.05, 3.43	1.46	-	3.25, 3.28	3.23, 3.28	3.11, 3.42	3.07, 3.44	1.40	-
ε-H	-	-	3.05	-	-	-	-	-	3.08, 3.15	-
NH δ										
NHC(NH ₂)=N	5.09	4.96	5.23	5.09	6.18, 6.36	6.18, 6.36	5.20	5.02	5.20	5.10
NH-Bn	7.34	7.41	6.95	7.15	7.64	7.64	7.40	7.40	6.96	6.92
CH ₂ (Bn)	4.18, 4.40	4.16, 4.38	4.25	4.25	4.36	4.05, 4.30	4.94, 4.28	3.96, 4.20	4.18	4.10, 4.18

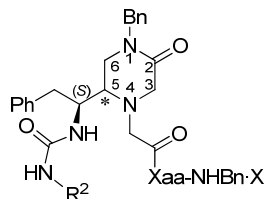
Tabla 4.14. Continuación.



	<i>(RS)</i> -85a		<i>(RS)</i> -85b		<i>(RS)</i> -85c		<i>(RS)</i> -86a		<i>(RS)</i> -86b	
¹³ C-RMN ^e										
C ₂	167.9	166.9	167.6	-	168.3	-	167.6	167.6	167.8	-
C ₃	55.8	-	55.6	-	55.4	-	55.6	-	55.3	-
C ₅	61.2	-	60.9	60.8	60.2	60.2	60.8	-	60.1	60.0
C ₆	44.8	44.8	44.6	44.6	44.3	44.2	44.6	45.0	44.3	44.3
1-Bn	49.5, 136.2	49.9, 136.1	49.5, 136.2	-	49.5, 136.2	-	49.5, 136.3	49.9, 136.1	49.5, 136.4	49.7, 136.1
4-(CH ₂ -CO)	59.0, 170.4	59.0, 169.7	58.8, 170.1	58.8, -	59.5, 171.0	-	55.6, 170.0	55.6, 170.0	58.6, 170.1	58.6, 170.1
C ₅ -CH	52.3	51.9	52.0	52.1	51.2	51.2	52.2	52.2	52.0	51.2
C ₅ -CH-CH ₂	36.9	37.6	37.2	-	38.1	38.4	37.3	38.2	37.5	38.2
NHCONH	157.5	157.6	156.6	156.6	156.2	-	157.7	157.9	157.7	158.0
Ph	137.3	137.3	137.0	137.0	137.2	137.1	137.2	137.1	137.1	137.1
R ²	138.7	139.6	138.6	138.6	139.4	139.0	44.0, 139.3	43.8, 139.8	44.0, 139.1	43.9, 139.6
Xaa(P)										
C _α	51.2	50.6	53.0	-	53.1	53.1	51.1	51.4	53.0	52.8
C _β	30.1	30.6	31.9	-	29.3	-	30.2	30.7	31.9	30.9
C _γ	26.6	26.5	22.7	-	25.4	-	26.6	26.6	22.7	22.4
C _δ	39.1	38.8	29.1	-	40.3	40.3	39.0	38.7	29.2	29.7
C _ε	-	-	40.3	-	-	-	-	-	40.4	-
NHC(NH ₂)=N	-	-	-	-	156.4	156.4	-	-	-	-
CO	172.7	172.9	172.3	172.3	172.0	172.0	172.4	172.6	172.1	172.1
Bn	42.0, 137.6	42.1, 137.4	43.6, 137.6	137.6	43.2, 138.1	43.2, 138.0	43.5, 137.7	43.5, 137.7	43.4, 137.8	43.5, 137.8

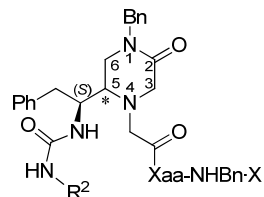
^aEspectros registrados a 500 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^bEspectros registrados a 125 MHz en CDCl₃, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas.

Tabla 4.15. Datos espectroscópicos de las ureas desprotegidas derivadas de 1-bencil-2-oxopiperazinas pseudotripeptídicas **87a-c** y **88a,b**.



	(RS)-87a		(RS)-87b		(RS)-87c		(RS)-88a		(RS)-88b	
R ²	Ph		Ph		Ph		Bn		Bn	
Xaa	Orn		Lys		Arg		Orn		Lys	
X	HCl		HCl		CF ₃ CO ₂ H		HCl		HCl	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H-RMN ^a										
3-H	3.33-4.11	3.33-4.11	3.26-4.20	3.26-4.20	3.28, 3.48	3.23, 3.77	3.35-3.82	3.35-3.82	3.34-3.87	3.34-3.87(
5-H	2.75	-	2.70	-	2.95	-	2.74	-	2.67	-
6-H	3.33-4.11	3.33-4.11	3.26-4.20	3.26-4.20	3.20, 3.30	3.14, 3.30	3.35-3.82	3.35-3.82	3.34-3.87	3.34-3.87
1-CH ₂ (Bn)	4.48, 4.62	4.51, 4.64	4.50, 4.70	-	4.30, 4.72	4.43, 4.54	4.47, 4.62	4.44, 4.58	4.50, 4.64	-
4-CH ₂	3.33-4.11	3.33-4.11	3.26-4.20	3.26-4.20	3.31	3.12, 3.42	3.35-3.82	3.35-3.82	3.44-3.87	3.44-3.87
5-CH	4.38	4.05	4.32	-	4.10	3.91	4.36	3.97	4.33	-
5-CH-CH ₂	2.70, 2.91	2.55, 2.85	2.72, 2.92	2.55, 2.88	2.71, 2.96	2.71, 2.96	2.65, 2.93	2.50, 2.79	2.69, 2.87	2.52, 2.80
5-CH-NH	6.80	6.80	6.86-7.41	6.86-7.41	6.49	-	6.49	6.42	6.48	6.40
CONH	8.85	8.81	8.80	8.83	8.64	-	6.90-7.40	6.90-7.40	6.94-7.41	6.94-7.41
Ph	6.76-7.38	6.76-7.38	6.83-7.41	6.83-7.41	6.73-7.36	6.73-7.36	6.90-7.40	6.90-7.40	6.94-7.41	6.94-7.41
CH ₂ (R ²)					-	-	4.03, 4.15	3.97, 4.14	4.03, 4.14	3.98, 4.14
Xaa										
α-NH	8.60	-	8.51	-	8.23	-	8.56	-	8.50	-
α-H	4.39	-	4.30	-	4.32	-	4.38	4.38	4.30	-
β-H	1.62, 1.82	1.58, 1.78	1.60, 1.72	1.60, 1.72	1.63, 1.72	-	1.65, 1.75	1.58, 1.72	1.54, 1.72	1.54, 1.72
γ-H	1.62	-	1.30	-	1.44	-	1.60	-	1.29	1.25, 1.35
δ-H	2.75	2.75	1.50	-	3.03	2.97, 3.07	2.78	2.78	1.52	-
ε-H	-	-	2.70	-	-	-	-	-	2.68	-
NH ₂ ·X ó NHC(NH ₂ ·X)=N	7.96	7.96	7.84	-	7.76	7.76	7.92	7.92	7.87	-
NH-Bn	8.72	8.70	8.62	8.58	8.57	8.59	8.72	8.74	8.60	8.62
CH ₂ (Bn)	4.22, 4.34	4.22, 4.34	4.24, 4.30	4.24, 4.30	4.23	4.04, 4.30	4.25, 4.30	4.25, 4.30	4.20, 4.29	4.22, 4.29

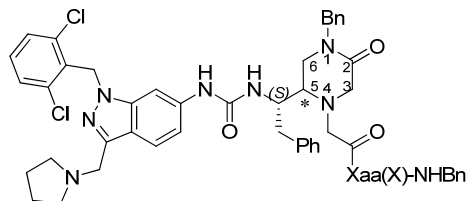
Tabla 4.15. Continuación.



¹³ C-RMN ^b	(RS)-87a		(RS)-87b		(RS)-87c		(RS)-88a		(RS)-88b	
C ₂	-	-	-	-	167.1	170.6	-	-	-	-
C ₃	53.6	53.5	53.7	53.8	54.9	54.9	53.5	53.5	54.0	54.0
C ₅	60.5	60.2	60.4	60.4	59.9	-	60.8	60.8	60.1	-
C ₆	43.7	43.7	43.8	43.8	45.3	46.1	43.7	43.7	44.2	44.2
1-Bn	49.2, 136.0	49.2, 136.0	49.2, 136.5	-	49.5, 137.6	48.9, 138.0	49.1, 136.4	49.1, 136.4	49.7, 136.9	-
4-(CH ₂ -CO)	53.9,-	53.9,-	-	-	55.4, 170.0	55.4, -	53.9, -	53.9, -	-	-
C ₅ -CH	49.8	-	49.2	-	50.8	51.6	49.7	49.7	49.5	-
C ₅ -CH-CH ₂	37.8	37.8	37.8	37.8	37.6	37.6	37.8	37.8	38.2	38.0
NHCONH	155.4	155.0	155.3	155.5	157.1	157.5	158.1	157.8	158.6	158.2
Ph	137.8	138.1	137.9	137.9	139.2	139.2	137.1	137.1	138.3	138.3
R ²	139.9	140.2	139.9	139.9	140.9	140.9	42.7, 140.4	42.7, 140.4	43.0, 140.8	43.0, 141.0
Xaa										
C _α	51.9	-	52.5	-	52.6	-	51.9	-	53.0	-
C _β	28.9	29.0	31.3	31.5	29.7	-	29.2	29.4	31.7	31.5
C _γ	23.4	-	22.2	-	25.4	-	23.4	-	22.7	22.7
C _δ	38.1	38.2	26.5	-	40.3	40.3	38.1	38.2	26.9	-
C _ε	-	-	38.4	-	-	-	-	-	38.9	-
NHC(NH ₂ ·X)=N	-	-			155.4	155.8	-	-		
CO	170.7	170.8	171.1	171.1	171.8	172.0	170.9	170.9	171.5	171.5
Bn	42.0, 139.1	42.0, 139.1	42.0, 139.2	42.0, 139.2	42.5, 139.7	42.5, 139.7	42.0, 139.0	42.0, 139.0	42.5, 139.7	42.5, 139.7

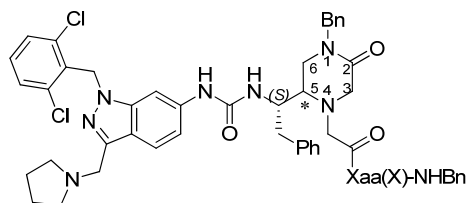
^aEspectros registrados a 500 MHz en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^bEspectros registrados a 125 MHz en DMSO-d₆, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas.

Tabla 4.16. Datos espectroscópicos más significativos de las ureas análogas del antagonista PAR1 de referencia RWJ58259 **90b,c** y **91b,c**.



	(RS)-90b		(RS)-90c		(RS)-91b		(RS)-91c	
Xaa	Lys		Arg		Lys		Arg	
X	Z		Pbf		H·HCl		H·CF ₃ CO ₂ H	
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
¹ H RMN ^a								
3-H	3.27, 3.53	-	3.32, 3.57	-	3.44-3.98	3.44-3.98	3.32, 3.47	3.30, 3.50
5-H	2.96	-	3.08	-	2.65	-	3.00	-
6-H	3.42, 3.47	3.24, 3.45	3.58, 3.62	-	3.44-3.98	3.44-3.98	3.26, 3.39	-
1-CH ₂ (Bn)	4.18, 4.95	-	4.20, 4.88	4.43, 4.58	4.46, 4.72	-	4.33, 4.74	-
4-CH ₂	3.45	-	3.26, 3.52	-	3.44-3.98	3.44-3.98	3.20, 3.42	-
5-CH	4.30	-	4.38	-	4.32	-	4.21	4.04
5-CH-CH ₂	2.68, 2.90	-	2.72	2.68, 2.80	2.74, 2.96	-	2.75, 3.06	2.63, 2.82
5-CH-NH	8.58	8.70	9.26	9.26	9.35	9.35	6.37	-
CONH	11.67	-	10.32	-	10.68	10.68	8.77	-
Ph	7.12-7.35	7.12-7.35	6.95-7.43	6.95-7.43	6.96-7.46	6.96-7.46	6.90-7.44	6.90-7.44
Indz	1.72, 1.88, 3.00	1.72, 1.88, 3.00	1.88, 1.97, 3.34	1.88, 1.97, 3.34	1.79, 1.85, 3.05	1.79, 1.85, 3.05	1.83, 3.35, 4.58	1.83, 3.35, 4.58
	3.45, 4.35, 5.50	3.43, 4.35, 5.50	3.68, 4.66, 5.55	3.68, 4.66, 5.55	3.35, 4.57, 5.59	3.35, 4.57, 5.59	5.60, 6.90-7.44,	5.57, 6.90-7.44,
	6.83, 7.02,	6.76, 7.02	6.95-7.43, 7.61	6.95-7.43, 7.61	6.96-7.46, 7.83	6.96-7.46, 7.83	7.72, 7.92, 9.92	7.72, 7.92, 9.92
	7.12-7.35, 7.91	7.12-7.35, 7.91	7.86	7.86	7.86, 10.68	7.86, 10.68		
Xaa								
α-NH	8.06	8.10	8.26	8.26	8.45	-	8.09	-
α-H	4.40	4.38	4.39	4.37	4.17-4.40	-	4.40	-
NH ₂ ·X ó NHC(NH ₂ ·X)=N	5.36	5.36	6.39	6.50	7.95	-	7.52	-
NH-Bn	7.34	-	7.86	7.91	8.46	8.46	8.58	8.57
CH ₂ (Bn)	4.28, 4.32	-	4.34, 4.38	4.10, 4.40	4.28	4.22, 4.28	4.28	4.14, 4.28

Tabla 4.16. Continuación.



	(RS)-90b		(RS)-90c		(RS)-91b		(RS)-91c	
¹³ C RMN ^b								
C ₂	166.9	-	169.6	-	-	-	169.8	-
C ₃	55.2	-	56.0	-	53.9	53.9	54.4	54.4
C ₅	60.7	-	63.2	-	60.3	-	59.7	-
C ₆	44.2	44.2	45.7	-	44.1	44.1	44.9	-
1-Bn	49.5, 135.9	-	50.5, 139.0	50.4, 139.1	49.2, 135.4	-	49.6, 137.4	-
4-(CH ₂ -CO)	57.5, 169.6	-	59.5, 171.1	-	-	-	55.2, 167.0	-
C ₅ -CH-CH ₂	37.7, 51.6	-	39.2, 54.1	39.2, -	37.9, 49.6	37.8, -	37.8, 50.5	-, 50.4
NHCONH	156.8	-	157.6	158.1	155.2	-	157.0	-
Ph ^c	136.8	-	140.3	140.3	136.0	136.3	139.0,	139.0,
	23.4, 47.6, 48.2	23.4, 47.6, 48.2	24.5, 49.0, 50.7	24.5, 49.0, 50.7	22.6, 47.2, 47.6	22.6, 47.2, 47.6	23.0, 47.7, 48.6	23.0, 47.7, 48.6
	52.4, 98.0	52.4, 98.0	55.1, 98.9	55.1, 98.9	52.5, 96.1	52.5, 96.1	53.5, 96.8	53.5, 96.8
Indz ^d	116.0, 118.6	115.2, 117.5	117.2, 119.7	117.2, 119.1	114.5, 120.6	114.5, 120.6	115.1, 118.0	115.1, 118.0
	119.2, 131.3	119.2, 131.3	121.4, 132.1	121.4, 132.1	117.7, 130.8	117.7, 130.8	120.7, 131.9	120.7, 131.9
	133.7, 139.3	133.7, 139.3	136.7, 138.3	136.7, 138.3	131.4, 139.6	131.4, 139.6	136.4, 140.2	136.4, 140.2
	141.7	141.7	141.9, 143.5	141.9, 143.5	141.3	141.3	141.9	141.9
Xaa								
C _α	53.4	53.4	54.1	54.1	53.9	-	52.2	-
CO	172.5	-	173.1	-	171.1	171.1	171.6	-
Bn ^c	43.5, 137.7	43.5, 137.7	44.0, 140.9	44.0, 140.9	42.0, 139.2	42.0, 139.2	42.5, 139.6	42.5, 139.6

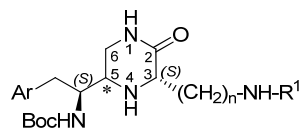
^aEspectros registrados a 500 MHz en CDCl₃ para **(RS)-90b**, en (CD₃)₂CO para **(RS)-90c** y en DMSO-d₆ para **(RS)-91b,c**, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. ^bEspectros registrados a 125 MHz en CDCl₃ para **(RS)-90b**, en (CD₃)₂CO para **(RS)-90c** y en DMSO-d₆ para **(RS)-91b,c**, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Algunas señales de los isómeros minoritarios no pudieron ser asignadas. Algunos carbonos del anillo de 2-oxopiperazina, así como los adyacentes, no se observaron por problemas de relajación. ^cLas señales correspondientes a CH aromáticos no están incluidas. ^dLas señales correspondientes a CH aromáticos del anillo de 2,6-diclorobencilo no están incluidas.

Tabla 4.17. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de los α -aminonitrilos **(RS)-94c** y **(RS)-95b,c^a**.

	(RS)-94c		(RS)-95b		(RS)-95c	
Ar	Ph		1-Boc-Ind		1-Boc-Ind	
n	3		4		3	
R ¹	C(NH ₂)=N-Pbf		Boc		C(NH ₂)=N-Pbf	
Conf. C ₁	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
(R:S)	(1:1)		(1:2)		(1:2)	
F. Molecular ^b	C ₃₅ H ₅₀ N ₆ O ₇ S		C ₃₄ H ₅₁ N ₅ O ₈		C ₄₂ H ₅₉ N ₇ O ₉ S	
M. Molecular	698.9		657.8		838.0	
ESI-MS [M+1] ⁺	699.6		658.8		838.7	
Rendimiento (%)	95		87		72	
t _R (min) (A:B) ^c	10.05	10.25	11.00	11.36	14.24	
t _R (min) (A:B) ^d	2.07		3.21	3.34	3.90	
¹ H-RMN ^e						
1-H	3.90	3.84	4.02	3.98	4.01	3.95
2-H	4.08	4.08	4.20	4.25	4.18	4.24
3-H	2.63, 2.73	2.63, 2.73	3.06, 3.31	3.01, 3.24	3.04, 3.28	3.04, 3.28
NH	2.85	2.81	2.82	2.74	2.84	2.75
α -H	3.53	3.36	3.58	3.40	3.58	3.41
NH-Boc	6.29	6.38	6.34	6.45	6.34	6.44
OMe	3.66	3.69	3.71	3.72	3.68	3.70
α -(CH ₂) _n	1.66, 1.78	1.66, 1.78	1.49, 1.52	1.49, 1.52	1.67, 1.79	1.67, 1.79
	3.24	3.24	1.81, 3.08	1.73, 3.08	3.24	3.24
NH-R ¹	6.49	6.49	5.94	5.94	6.47	6.47
J _{2-H,NH}	9.5	9	9	8.5	9.5	-
Ar	7.18-7.24	7.18-7.24	7.26, 7.32	7.26, 7.32	7.25, 7.32	7.25, 7.32
	7.24-7.32	7.24-7.32	7.59, 7.64	7.59, 7.69	7.58, 7.62	7.58, 7.67
			8.14	8.14	8.13	8.13
R ¹	6.49	6.49	-	-	6.47	6.47
¹³ C-RMN ^f						
CN	119.3	119.4	119.6	119.7	119.5	119.6
C ₁	54.7	54.5	54.5	54.0	54.4	54.0
C ₂	53.8	54.5	53.3	53.7	53.3	53.8
C ₃	37.3	37.1	27.3	27.0	27.0	26.9
C α	59.5	60.9	59.9	61.5	59.7	61.2
CO	174.4	174.7	174.5	175.0	174.3	174.8
OMe	52.1	52.0	52.1	52.0	52.1	52.0
C α -(CH ₂) _n	26.6, 31.0	26.0, 31.1	23.6, 30.6	23.6, 30.6	27.2, 31.0	27.0, 31.2
	41.3	41.3	33.5, 40.8	33.7, 40.9	41.4	41.4
			115.9, 117.6	115.9, 117.7	115.6, 117.6	115.6, 117.7
Ar	127.1, 129.1	127.2, 129.2	119.9, 123.4	119.9, 123.4	119.9, 123.3	119.9, 123.3
	130.8, 139.4	130.8, 139.4	124.8, 125.1	124.8, 125.1	124.8, 125.1	124.8, 125.1
			131.7, 136.4	131.5, 136.3	131.6, 136.3	131.4, 136.3
R ¹	157.9	157.9	-	-	157.3	157.3

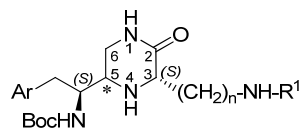
^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-100% de A en B en 15 min para **(RS)-94c** y **(RS)-95b** y gradiente 70-100% de A en B en 15 min para **(RS)-95b**. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 70-95% de A en B en 5 min para **(RS)-94c** y **(RS)-95b** y gradiente 80-95% de A en B en 5 min para **(RS)-95c**. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas.

Tabla 4.18. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 2-oxopiperazinas **96c** y **97b,c**.^a



	(<i>R</i>)- 96c	(<i>S</i>)- 96c	(<i>R</i>)- 97b	(<i>S</i>)- 97b	(<i>R</i>)- 97c	(<i>S</i>)- 97c
Ar	Ph	Ph	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind
n	3	3	4	4	3	3
R ¹	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf	Boc	Boc	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₃₄ H ₅₀ N ₆ O ₆ S	C ₃₄ H ₅₀ N ₆ O ₆ S	C ₃₃ H ₅₁ N ₅ O ₇	C ₃₃ H ₅₁ N ₅ O ₇	C ₄₁ H ₅₉ N ₇ O ₈ S	C ₄₁ H ₅₉ N ₇ O ₈ S
M. Molecular	670.9	670.9	629.8	629.8	810.0	810.0
ESI-MS [M+1] ⁺	671.6	671.2	630.8	630.8	810.9	810.9
Rendimiento (%)	40	40	40	20	40	20
Punto de Fusión ^c (°C)	136-138	138-140	84-86	76-78	118-120	118-120
[α] _D	-6.0 (c 1.0, CH ₂ Cl ₂)	-27 (c 1.0, CH ₂ Cl ₂)	-12 (c 1.6, CH ₂ Cl ₂)	-10 (c 1.4, CH ₂ Cl ₂)	-5.1 (c 1.0, CH ₂ Cl ₂)	-15 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)
t _R (min) (A:B) ^d	18.05	18.13	13.89	13.56	8.70	9.05
t _R (min) (A:B) ^e	3.98	4.13	12.78	12.24	2.67	2.55
¹ H-RMN ^f						
1-H	6.85	6.82	6.78	6.73	6.90	6.85
3-H	3.30	3.28	3.31	3.27	3.35	3.32
5-H	3.07	3.02	3.17	3.12	3.19	3.12
6-H	3.24, 3.43	3.24	3.26, 3.47	3.26	3.27, 3.48	3.27
3-(CH ₂) _n	1.60, 1.70, 1.80	1.60, 1.80, 1.90	1.52, 1.54, 1.69	1.48, 1.50, 1.59	1.69, 1.73, 1.82	1.68, 1.70, 1.92
	3.18, 3.30	3.22	1.84, 3.10	1.94, 3.08	1.89, 3.28	3.24
5-CH	3.83	3.87	3.87	4.00	3.90	4.00
5-CH-CH ₂	2.75, 3.23	2.82, 2.96	2.89, 3.43	2.99, 3.10	2.87, 3.40	2.97, 3.07
NH-Boc	5.96	5.98	6.01	6.06	6.06	6.09
NH-R ¹	6.58	6.52	5.95	5.94	6.58	6.53
J _{5-CH,NH}	9.5	9	9	9.5	9.5	9.5
Ar	7.12-7.20	7.14-7.23	7.23, 7.30, 7.51	7.25, 7.31, 7.55	7.22, 7.30, 7.51	7.23, 7.31, 7.54
	7.20-7.28	7.23-7.33	7.63, 8.12	7.70, 8.13	7.61, 8.12	7.68, 8.12
R ¹	6.58	6.52	-	-	6.58	6.53

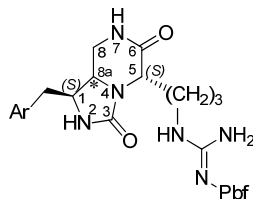
Tabla 4.18. Continuación.



	(<i>R</i>)- 96c	(<i>S</i>)- 96c	(<i>R</i>)- 97b	(<i>S</i>)- 97b	(<i>R</i>)- 97c	(<i>S</i>)- 97c
¹³ C-RMN ^g						
C ₂	173.6	172.5	173.0	171.7	173.0	171.8
C ₃	57.4	59.9	56.7	59.7	56.7	59.2
C ₅	52.4	56.2	52.0	55.5	51.8	55.7
C ₆	46.6	46.8	46.4	46.2	46.1	46.1
C ₅ -CH	55.8	55.2	53.6	53.0	53.6	53.0
C ₅ -CH-CH ₂	38.8	39.1	27.7	28.0	27.7	27.9
C ₃ -(CH ₂) _n	28.0, 29.5, 42.2,	27.1, 29.6, 41.2,	24.6, 30.7, 31.2 41.2	23.9, 31.0, 32.6 41.1	27.7, 29.6, 41.5	26.5, 29.6, 41.6
			115.8, 118.9	115.6, 118.5	115.8, 118.9	115.8, 118.5
Ar	127.4, 129.6 130.9, 140.9	127.6, 129.7 130.8, 140.5	120.1, 123.1 124.3, 124.9 132.1, 136.3	120.1, 123.3 124.6, 125.0 131.8, 136.4	120.1, 123.2 124.3, 124.9 132.0, 136.4	120.1, 123.2 124.5, 125.0 131.8, 136.3
R ¹	158.0	158.0	-	-	157.3	157.3

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos blancos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cCompuestos recrystalizados en Hexano. ^dHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min para **96c**, gradiente 30-100% de A en B en 30 min para **97b** y isocrático (A:B) 50:50% para **97c**. ^eHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 5 min para **96c**, gradiente 30-45% de A en B en 5 min para **97b** y isocrático (A:B) 60:40% para **97c**. ^fEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a los grupos protectores no están incluidas. ^gEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupo protectores no están incluidas.

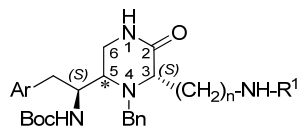
Tabla 4.19. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 3,6-dioxoocta-hidroimidazo[1,5-*a*]pirazinas **98c** y **99c**^a.



	(<i>R</i>)- 98c	(<i>S</i>)- 98c	(<i>R</i>)- 99c	(<i>S</i>)- 99c
Ar	Ph	Ph	1-Ind	1-Ind
Conf. C _{8a}	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₃₀ H ₄₀ N ₆ O ₅ S	C ₃₀ H ₄₀ N ₆ O ₅ S	C ₃₂ H ₄₁ N ₇ O ₅ S	C ₃₂ H ₄₁ N ₇ O ₅ S
M. Molecular	596.7	596.7	635.8	635.8
ESI-MS [M+1] ⁺	597.5	597.6	636.6	636.6
Rendimiento (%)	51	60	40	40
[α] _D	+4.1 (<i>c</i> 1.0, CH ₂ Cl ₂)	-9.9 (<i>c</i> 1.2, CH ₂ Cl ₂)	-4.4 (<i>c</i> 0.8, CH ₂ Cl ₂)	-4.6 (<i>c</i> 0.6, CH ₂ Cl ₂)
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^c	20.41	21.31	27.19	27.39
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^d	4.60	4.61	12.00	11.96
¹ H-RMN ^e				
1-H	4.29	3.77	4.41	3.85
2-H	5.86	6.01	5.94	6.00
5-H	4.13	3.86	4.14	3.86
7-H	7.14	7.13	7.10	7.02
8-H	3.27, 3.65	2.74, 3.07	3.30, 3.68	2.78, 3.06
8a-H	3.97	3.51	4.00	3.52
1-CH ₂	2.87	2.87, 3.07	3.04	3.02, 3.17
5-(CH ₂) ₃	1.64, 1.90, 3.19	1.44, 1.66, 1.97 2.42, 3.17	1.58, 1.70, 1.90 3.21	1.40, 1.65, 1.96, 2.42, 3.16
<i>J</i> _{1-H,1-CH2}	7, 7	6, 7.5	7.5, 7.5	-
<i>J</i> _{1-H,8a-H}	7	10	7	10
<i>J</i> _{5-H,5-CH2}	4, 9.5	3, 6	4, 9.5	-
<i>J</i> _{7-H,8-H}	4	5.5	4.5	5.5
<i>J</i> _{8-H,8a-H}	5, 11.5	3.5, 10	4.5, 11.5	3.5, 10
Ar	7.12-7.17	7.21-7.38	7.03, 7.10, 7.31	7.02, 7.11, 7.29
	7.28-7.35		7.41, 7.61, 10.18	7.40, 7.61, 10.18
¹³ C-RMN ^f				
C ₁	53.4	56.0	53.7	59.7
C ₃	162.3	160.3	161.8	161.0
C ₅	54.4	57.2	53.7	57.9
C ₆	170.6	169.6	170.0	170.2
C ₈	41.7	44.0	40.6	44.9
C _{8a}	52.8	58.7	52.1	55.9
C ₁ -CH ₂	36.4	40.2	25.7	30.7
C ₅ -(CH ₂) ₃	26.9, 30.6, 41.8	24.2, 27.7, 40.8	26.3, 30.5, 41.2	28.8, 28.3, 41.4
NHC(NH ₂)=N	158.0	156.6	157.3	157.2
Ar	128.1, 130.2	126.9, 128.8	111.5, 112.3, 117.4	110.9, 112.3, 117.4
	130.4, 139.4	129.5, 137.4	119.2, 119.6, 122.4	119.2, 119.7, 122.3
			123.8, 128.2, 137.7	124.3, 128.4, 137.6

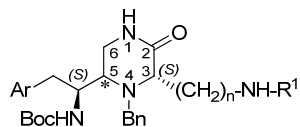
^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupes. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 10-100% de A en B en 30 min **98c** y gradiente 10-60% de A en B en 30 min para **99c**. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 5-95% de A en B en 5 min para **98c** y gradiente 10-60% de A en B en 15 min para **99c**. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas.

Tabla 4.20. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 4-bencil-2-oxopiperazinas **100c** y **101b,c^a**.



	(<i>R</i>)- 100c	(<i>S</i>)- 100c	(<i>R</i>)- 101b	(<i>S</i>)- 101b	(<i>R</i>)- 101c	(<i>S</i>)- 101c
Ar	Ph	Ph	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind
n	3	3	4	4	3	3
R ¹	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf	Boc	Boc	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₄₁ H ₅₆ N ₆ O ₆ S	C ₄₁ H ₅₆ N ₆ O ₆ S	C ₄₀ H ₅₇ N ₅ O ₇	C ₄₀ H ₅₇ N ₅ O ₇	C ₄₈ H ₆₅ N ₇ O ₈ S	C ₄₈ H ₆₅ N ₇ O ₈ S
M. Molecular	760.4	760.4	719.9	719.9	900.1	900.1
ESI-MS [M+1] ⁺	761.6	761.6	720.9	720.9	901.1	901.1
Rendimiento (%)	80	70	70	80	75	60
[α] _D	-25 (c 1, CH ₂ Cl ₂)	+21 (c 1, CH ₂ Cl ₂)	+0.9 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)	+13.6 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	-48 (c 1.5, CH ₂ Cl ₂)	-14 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)
Punto de Fusión ^c (°C)	102-104	100-102	76-78	84-86	106-108	112-114
t _R (min) (A:B) ^d	16.05	16.01	11.27	11.86	7.35	7.32
t _R (min) (A:B) ^e	3.68	3.77	4.02	4.02	2.56	2.54
¹ H-RMN ^f						
1-H	6.94	7.12-7.48	6.82	7.03	6.97	7.17
3-H	3.06	3.06	3.04	3.07(t, J=7)	3.03	3.06
5-H	3.40	3.00	3.49	3.14	3.49	3.14
6-H	3.44, 3.60	3.38, 3.53	3.50, 3.60	3.48, 3.53	3.50, 3.61	3.47, 3.60
3-(CH ₂) _n	1.73, 3.00	1.27, 1.59, 2.93, 3.01	1.29, 1.34, 1.61 1.72, 1.83, 3.00	1.21, 1.31, 1.36 1.68, 2.94	1.82, 3.06	1.43, 1.55, 2.97, 3.06
4-CH ₂ (Bn)	3.54, 4.21	3.72, 4.06	3.60, 4.22	3.80, 4.08	3.61, 4.20	3.76, 4.05
5-CH	4.10	3.99	4.23	4.17	4.20	4.14
5-CH-CH ₂	2.78, 3.50	2.68, 3.10	2.88, 3.63	2.92, 3.24	2.88, 3.61	2.86, 3.16
NH-Boc	6.01	6.17	6.08	6.13	6.10	6.18
NH-R ¹	6.48	6.44	5.80	7.03	6.47	6.40
J _{5-CH,NH}	9.5	9	9.5	8.5	9.5	9
J _{5-H,6-H}	4.5 y 12.5	6 y 13	4.5 y 12.5	6 y 13	4.5 y 12.5	6 y 13
Ar	7.14-7.52	7.12-7.48	7.18, 7.29, 7.52 7.53, 8.12	7.26, 7.34, 7.51 7.66, 8.14	7.15, 7.28, 7.51 7.53, 8.12	7.22, 7.31, 7.49 7.64, 8.13
R ¹	6.48	6.44	-	-	6.47	6.40

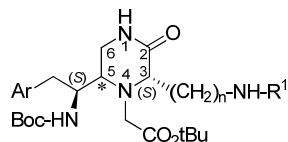
Tabla 4.20. Continuación.



	(<i>R</i>)- 100c	(<i>S</i>)- 100c	(<i>R</i>)- 101b	(<i>S</i>)- 101b	(<i>R</i>)- 101c	(<i>S</i>)- 101c
¹³ C-RMN ^g						
C ₂	172.3	172.6	172.0	173.2	172.0	173.4
C ₃	61.2	63.1	62.2	64.0	61.9	63.5
C ₅	54.4	62.7	55.4	63.9	55.4	63.4
C ₆	40.8	39.5	41.5	40.2	41.5	40.3
C ₃ -(CH ₂) _n	26.3, 27.7, 41.0	25.9, 30.9, 40.5	24.5, 30.3, 31.1, 41.1	24.1, 30.0, 34.4, 40.9	27.1, 28.5, 41.3	27.6, 31.4, 41.3
4-Bn	51.0, 139.0	61.6, 139.5	51.9, 139.7	62.4, 140.2	51.8, 139.6	62.3, 140.0
C ₅ -CH	52.7	54.8	51.3	52.9	51.4	53.5
C ₅ -CH-CH ₂	37.9	36.1	28.2	26.6	28.2	26.6
Ar	139.8	139.7	118.8, 132.0, 136.4,	119.0, 131.9, 136.4	118.8, 132.0, 136.4	118.9, 131.9, 136.3
R ¹	156.6	156.6	-	-	157.4	157.3

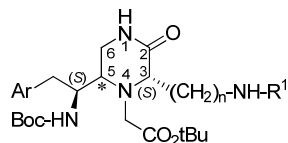
^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cCompuestos recristalizados en Hexano. ^dHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-100% de A en B en 30 min para **100c**, gradiente 70-100% de A en B en 30 min para **101b** y gradiente 80-100% de A en B en 30 min para **101c**. ^eHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-95% de A en B en 5 min para **100c**, gradiente 70-95% de A en B en 5 min para **101b** y gradiente 80-95% de A en B en 5 min para **101c**. ^fEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^gEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y a CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.21. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 4-acetato-*terc*-butil-2-oxopiperazinas **102c** y **103b,c**.^a



	(<i>R</i>)-102c	(<i>S</i>)-102c	(<i>R</i>)-103b	(<i>S</i>)-103b	(<i>R</i>)-103c	(<i>S</i>)-103c
Ar	Ph	Ph	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind
n	3	3	4	4	3	3
R ¹	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf	Boc	Boc	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₃₄ H ₅₀ N ₆ O ₆ S	C ₃₄ H ₅₀ N ₆ O ₆ S	C ₃₉ H ₆₁ N ₅ O ₉	C ₃₉ H ₆₁ N ₅ O ₉	C ₄₇ H ₆₉ N ₇ O ₁₀ S	C ₄₇ H ₆₉ N ₇ O ₁₀ S
M. Molecular	785.0	785.0	743.9	743.9	924.2	924.2
ESI-MS [M+1] ⁺	785.7	785.8	744.9	744.9	925.2	925.1
Rendimiento (%)	70	70	75	60	65	50
[α] _D	-19 (c 1.0, CH ₂ Cl ₂)	+11 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	+3 (c 1.7, CH ₂ Cl ₂)	+10 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	+19 (c 1.4, CH ₂ Cl ₂)	+9.0 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)
Punto de Fusión ^c (°C)	100-102	98-100	78-80	80-82	102-104	120-122
t _R (min) (A:B) ^d	15.95	14.98	11.54	12.04	7.48	7.19
t _R (min) (A:B) ^e	3.65	3.51	3.74	3.87	2.49	2.44
¹ H-RMN ^f						
1-H	6.90	7.10-7.21	6.84	7.00	6.92	7.15
3-H	3.15	3.31	3.19	3.30	3.20	3.32
5-H	3.32	3.19	3.39	3.27	3.40	3.21
6-H	3.30, 3.40	3.38, 3.50	3.41	3.48, 3.53	3.49	3.46, 3.55
3-(CH ₂) _n	1.72, 1.95, 3.30	1.70, 1.72, 3.24	1.60, 1.80, 3.12	1.53, 1.56, 1.77	1.81, 3.33	1.77, 3.24
4-(CH ₂ -CO ₂ ^t Bu)	1.46, 3.15, 3.61	1.45, 3.51, 3.65	1.49, 3.19, 3.64	1.45, 3.57, 3.68	1.47, 3.21, 3.64	1.44, 3.55, 3.66
5-CH	3.85	3.92	3.39	4.07	3.92	4.05
5-CH-CH ₂	2.67, 3.50	2.63, 3.10	2.78, 3.66	2.80, 3.23	2.80, 3.60	2.79, 3.20
NH-Boc	5.97	6.16	6.07	6.21	6.07	6.24
NH-R ¹	6.55	6.55	5.93	5.93	6.53	6.50
J _{5-H,6-H}	4.5 y 12.5	6 y 13	-	6 y 13	-	6 y 13
Ar	7.13-7.19	7.10-7.21	7.23, 7.30, 7.51	7.26, 7.31, 7.52	7.21, 7.30, 7.52	7.24, 7.31, 7.51
R ¹	6.55	6.55	7.64, 8.13	7.67, 8.13	7.61, 8.12	7.64, 8.12
					6.53	6.50

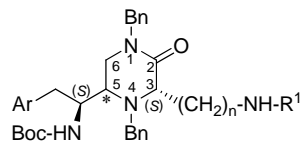
Tabla 4.21. Continuación



	(<i>R</i>)- 102c	(<i>S</i>)- 102c	(<i>R</i>)- 103b	(<i>S</i>)- 103b	(<i>R</i>)- 103c	(<i>S</i>)- 103c
¹³ C-RMN ^g						
C ₂	171.8	172.2	171.8	172.6	171.8	171.3
C ₃	64.9	65.3	65.2	65.3	64.9	64.6
C ₅	55.5	61.4	55.8	60.1	55.6	60.9
C ₆	41.8	40.6	41.8	39.9	41.8	39.9
C ₃ -(CH ₂) _n	27.3, 28.7	27.0, 32.3, 42.3	24.7, 30.4, 31.1, 41.2	23.8, 30.4, 34.5, 41.1	27.8, 41.6	26.4, 31.6, 41.6
4-(CH ₂ -CO ₂ ^t Bu)	28.3, 51.7	28.9, 57.4	28.3, 52.1	28.3, 57.0	28.5, 51.9	28.3, 56.9
	81.4, 171.0	82.4, 171.2	81.5, 171.0	81.7, 171.3	81.6, 171.0	81.7, 171.3
C ₅ -CH	54.0	54.8	51.9	52.0	51.7	52.1
C ₅ -CH-CH ₂	38.2	36.4	27.8	25.6	27.4	25.5
Ar	140.5	141.3	118.9, 132.0, 136.4	119.1, 131.8, 136.4	118.9, 131.9, 136.4	119.1, 131.8, 136.4
R ¹	157.4	158.0	-	-	157.4	157.3

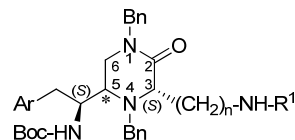
^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cCompuestos recrystalizados en Hexano. ^dHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-100% de A en B en 30 min para **102c**, gradiente 70-100% de A en B en 30 min para **103b** y gradiente 80-100% de A en B en 30 min para **103c**. ^eHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-95% de A en B en 5 min para **102c**, gradiente 70-95% de A en B en 5 min para **103b** y gradiente 80-95% de A en B en 5 min para **103c**. ^fEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^gEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y a CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.22. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 1,4-bencil-2-oxopiperazinas **104c** y **107b,c^a**.



	(<i>R</i>)- 104c	(<i>S</i>)- 104c	(<i>R</i>)- 107b	(<i>S</i>)- 107b	(<i>R</i>)- 107c	(<i>S</i>)- 107c
Ar	Ph	Ph	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind
n	3	3	4	4	3	3
R ¹	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf	Boc	Boc	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₄₈ H ₆₂ N ₆ O ₆ S	C ₄₈ H ₆₂ N ₆ O ₆ S	C ₄₇ H ₆₃ N ₅ O ₇	C ₄₇ H ₆₃ N ₅ O ₇	C ₅₅ H ₇₁ N ₇ O ₈ S	C ₅₅ H ₇₁ N ₇ O ₈ S
M. Molecular	851.1	851.1	810.0	810.0	990.3	990.3
ESI-MS [M+1] ⁺	852.0	852.0	811.2	811.2	991.1	991.2
Rendimiento (%)	48	45	80	80	40	52
[α] _D	-12 (c 1, CH ₂ Cl ₂)	+21 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)	-15 (c 1.4, CH ₂ Cl ₂)	+11 (c 1.3, CH ₂ Cl ₂)	-12 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	+22 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)
t _R (min) (A:B) ^c	7.14	6.96	12.75	12.99	13.05	13.87
t _R (min) (A:B) ^d	2.38	2.23	4.15	4.24	5.12	5.07
¹ H-RMN ^e						
3-H	3.12	3.23	3.17	3.27	3.16	3.26
5-H	3.48	3.07	3.59	3.16	3.58	3.15
6-H	3.32, 3.57	3.43, 3.47	3.37, 3.59	3.46, 3.57	3.39, 3.58	3.53
1-CH ₂ (Bn)	4.47, 4.78	4.49, 4.69	4.51, 4.79	4.57, 4.66	4.51, 4.79	4.53, 4.69
3-(CH ₂) _n	1.81, 3.05	1.56, 1.67, 2.99, 3.07	1.31, 1.61, 1.80 1.86, 3.03	1.28, 1.34, 1.43 1.71, 2.95, 3.05	1.85, 3.09	1.73, 3.00, 3.07
4-CH ₂ (Bn)	3.50, 4.17	3.77, 4.03	3.54, 4.18	3.85, 4.08	3.54, 4.17	3.81, 4.04
5-CH	4.06	3.97	4.18	4.12	4.14	4.10
5-CH-CH ₂	2.71, 3.48	2.60, 3.04	2.80, 3.59	2.85, 3.19	2.83, 3.53	2.78, 3.13
NH-Boc	5.90	6.09	6.00	6.09	5.98	6.13
NH-R ¹	6.50	6.41	5.84	5.80	6.47	6.39
J _{5-CH,NH}	9.5	9	9.5	9	9.5	9
J _{5-H,6-H}	4 y 12	6 y 12	7 y 12	5.5 y 11	4 y 12	6 y 12
Ar	7.09-7.45	7.11-7.29	7.16, 7.28, 7.48 7.51, 8.11	7.22, 7.31, 7.47 7.61, 8.12	7.15, 7.26, 7.48 7.54, 8.10	7.20, 7.29, 7.45 7.58, 8.12
R ¹	6.50	6.41	-	-	6.47	6.39

Tabla 4.22. Continuación

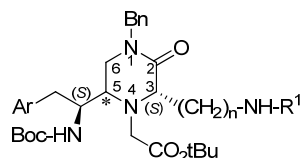


	(<i>R</i>)-104c	(<i>S</i>)-104c	(<i>R</i>)-107b	(<i>S</i>)-107b	(<i>R</i>)-107c	(<i>S</i>)-107c
¹³ C RMN ^f						
C ₂	170.2	171.8	171.0	171.7	170.8	171.8
C ₃	61.5	63.8	62.5	64.3	62.2	63.7
C ₅	55.0	63.4	55.6	63.6	55.7	63.2
C ₆	45.0	45.1	45.8	45.0	45.6	45.2
1-Bn	49.5, 138.1	49.8, 138.5	50.2, 138.9	49.8, 138.7	50.2, 138.7	49.9, 138.6
C ₃ -(CH ₂) _n	26.5, 27.6, 40.6	26.6, 31.9, 41.2	24.5, 30.3, 31.2, 41.1	24.2, 31.2, 34.8, 41.0	27.9, 28.8, 41.3	26.8, 31.9, 41.3
4-Bn	51.0, 138.0	62.0, 139.9	51.9, 139.5	62.3, 139.9	51.9, 139.4	62.0, 139.7
C ₅ -CH	52.4	55.2	51.3	52.8	51.3	53.2
C ₅ -CH-CH ₂	37.6	36.5	27.9	26.4	27.2	26.3
Ar	139.5	140.3	118.7, 131.9, 136.3,	119.0, 131.8, 136.3	118.7, 131.9, 136.3,	118.8, 131.9, 136.3,
R ¹	156.6	157.2	-	-	157.3	157.2

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-100% de A en B en 30 min.

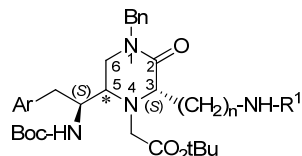
^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-95% de A en B en 15 min. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y a CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.23. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 1-bencil-4-acetato-*terc*-butil-2-oxopiperazinas **110c** y **112b,c^a**.



	(<i>R</i>)-110c	(<i>S</i>)-110c	(<i>R</i>)-112b	(<i>S</i>)-112b	(<i>R</i>)-112c	(<i>S</i>)-112c
Ar	Ph	Ph	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind
n	3	3	4	4	3	3
R ¹	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf	Boc	Boc	C(NH ₂)=N-Pbf	C(NH ₂)=N-Pbf
Conf. C ₅	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₄₇ H ₆₆ N ₆ O ₈ S	C ₄₇ H ₆₆ N ₆ O ₈ S	C ₄₆ H ₆₇ N ₅ O ₉	C ₄₆ H ₆₇ N ₅ O ₉	C ₅₄ H ₇₅ N ₇ O ₁₀ S	C ₅₄ H ₇₅ N ₇ O ₁₀ S
M. Molecular	875.1	875.1	834.0	834.0	1014.3	1014.3
ESI-MS [M+1] ⁺	876.1	876.1	835.1	835.1	1015.2	1015.2
Rendimiento (%)	51	50	80	70	50	57
[α] _D	-2.8 (c 1, CH ₂ Cl ₂)	+16 (c 1, CH ₂ Cl ₂)	-4.2 (c 1.5, CH ₂ Cl ₂)	+7.0 (c 1.3, CH ₂ Cl ₂)	+3.1 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)	+20 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)
t _R (min) (A:B) ^c	6.90	6.80	11.80	12.41	12.48	13.67
t _R (min) (A:B) ^d	2.21	2.51	4.09	4.28	4.77	4.88
¹ H-RMN ^e						
3-H	3.35	3.46	3.33	3.44	3.32	3.49
5-H	3.39	3.22	3.46	3.30	3.50	3.28
6-H	3.22, 3.37	3.40	3.29, 3.40	3.47	3.29, 3.41	3.49
1-CH ₂ (Bn)	4.35, 4.83	4.53, 4.70	4.38, 4.84	4.64	4.37, 4.84	4.59, 4.69
3-(CH ₂) _n	1.88, 3.30	1.75, 3.24	1.62, 1.79, 1.87, 3.16	1.55, 1.57, 1.80, 3.09	1.90, 3.34	1.76, 1.80, 3.26
4-(CH ₂ -CO ₂ ^t Bu)	1.46, 3.13, 3.60	1.46, 3.53, 3.67	1.48, 3.13, 3.62	1.45, 3.58, 3.70	1.46, 3.19, 3.64	1.45, 3.58, 3.68
5-CH	3.30	3.87	3.91	4.02	3.90	4.01
5-CH-CH ₂	2.62, 3.46	2.55, 3.03	2.75, 3.62	2.71, 3.17	2.78, 3.56	2.68, 3.13
NH-Boc	5.89	6.10	5.98	6.14	5.97	6.15
NH-R ¹	6.55	6.54	5.93	5.92	6.52	6.49
J _{5-CH,NH}	9.5	8	9.5	8	9.5	8
J _{5-H,6-H}	5 y 12	7	4 y 12		4 y 12	-
Ar	7.10-7.38	7.10-7.40	7.22, 7.30, 7.47 7.62, 8.11	7.26, 7.32, 7.48 7.61, 8.11	7.20, 7.29, 7.49 7.58, 8.11	7.22, 7.31, 7.47 7.58, 8.11
R ¹	6.55	6.30	-	-	6.52	6.49

Tabla 4.23. Continuación

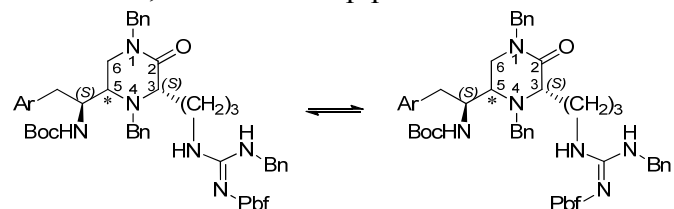


	(<i>R</i>)-110c	(<i>S</i>)-110c	(<i>R</i>)-112b	(<i>S</i>)-112b	(<i>R</i>)-112c	(<i>S</i>)-112c
¹³ C RMN ^f						
C ₂	170.6	171.1	170.6	171.0	170.8	171.3
C ₃	65.3	65.0	65.2	65.0	65.6	65.6
C ₅	55.7	60.7	55.8	60.9	56.0	60.9
C ₆	46.0	44.9	46.1	44.9	40.0	44.8
1-Bn	50.2, 138.6	49.9, 138.5	50.2, 138.7	50.0, 138.5	50.2, 138.7	50.0, 138.7
C ₃ -(CH ₂) _n	27.4, 28.9, 41.6	26.4, 32.2, 41.6	27.5, 28.5, 41.6	26.5, 32.2, 41.7	24.7, 30.4, 31.3, 41.2	23.9, 30.8, 35.0, 41.1
4-(CH ₂ -CO ₂ ^t Bu)	28.3, 51.7	28.3, 56.4	28.3, 51.7	28.3, 56.6	28.3, 51.9	28.3, 56.9
	81.5, 170.9	81.7, 171.3	81.7, 170.9	81.7, 171.3	81.5, 170.7	81.7, 171.2
C ₅ -CH	53.6	54.0	51.9	52.0	52.1	51.9
C ₅ -CH-CH ₂	38.0	35.5	27.5	25.3	27.6	25.3
Ar	140.4	140.6	118.8, 131.9, 136.3	119.0, 131.7, 136.3	118.9, 131.9, 136.3,	119.1, 131.7, 136.4
R ¹	157.4	157.3	157.4	157.3	-	-

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-100% de A en B en 30 min.

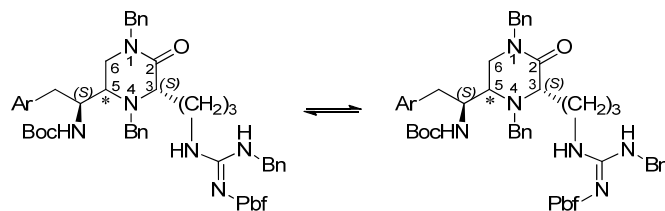
^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-95% de A en B en 15 min. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y a CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.24. Datos analíticos y espectroscópicos de las 1,4-bencil-2-oxopiperazinas benciladas en el guanidino **106c** y **109c**^a.



	(R)-106c		(S)-106c		(R)-109c		(S)-109c	
Proporción	5	2	5	3	2	1	3	1
Ar	Ph		Ph		1-Boc-Ind		1-Boc-Ind	
Conf. C ₅	(R)		(S)		(R)		(S)	
F. Molecular ^b	C ₅₅ H ₆₈ N ₆ O ₆ S		C ₅₅ H ₆₈ N ₆ O ₆ S		C ₆₂ H ₇₇ N ₇ O ₈ S		C ₆₂ H ₇₇ N ₇ O ₈ S	
M. Molecular	941.2		941.2		1080.4		1080.4	
ESI-MS [M+1] ⁺	942.2		942.2		1081.2		1081.2	
Rendimiento (%)	14		11		15		15	
t _R (min) (A:B) ^c	13.14		12.49	13.19	20.20		20.70	21.64
t _R (min) (A:B) ^d	4.43		4.22	4.44	8.47		8.56	8.99
¹ H-RMN ^e								
3-H	3.15	3.15	3.26	3.26	3.14	3.14	3.30	3.27
5-H	3.50	3.50	3.08	3.08	3.55	3.55	3.14	3.14
6-H	3.33, 3.57	3.30, 3.59	3.45, 3.48	3.45, 3.48	3.38, 3.57	3.38, 3.57	3.50, 3.55	3.50, 3.55
1-CH ₂ (Bn)	4.49, 4.79	4.49, 4.81	4.49, 4.68	4.49, 4.64	4.54, 4.78	4.48, 4.81	4.53, 4.69	4.50, 4.63
3-(CH ₂) ₃	1.80, 3.05	1.80, 3.05	1.64, 3.08	1.64, 3.08	1.83, 1.92, 3.07	1.83, 1.92, 3.07	1.64, 1.71, 3.11	1.64, 1.71, 3.11
4-CH ₂ (Bn)	3.52, 4.18	3.51, 4.10	3.78, 4.06	3.77, 4.06	3.55, 4.20	3.55, 4.20	3.82, 4.07	3.81, 4.04
5-CH	3.12	3.12	3.08	3.08	4.22	4.22	4.13	4.13
5-CH-CH ₂	2.74, 3.56	2.66, 3.41	2.62, 3.09	2.62, 3.09	2.90, 3.58	2.83, 3.47	2.79, 3.15	2.79, 3.15
NH-Boc	5.89	5.86	6.05	6.05	5.99	5.94	6.12	6.07
J _{5-CH,NH}	9.5	10	8.5	8.5	9.5	9.5	8.5	8.5
NHC(NHBn)=N								
NH	7.04-7.57	7.04-7.57	7.20	7.20	7.07-7.55	7.07-7.55	7.03-7.37	7.03-7.37
CH ₂ (Bn)	4.39, 4.43	4.60	4.40	4.58	4.43	4.64	4.38	4.59, 4.60
J _{NH,CH2} (Bn)	5	-	6	-	5.5	-	6	-
Ar	7.04-7.57	7.04-7.57	7.02-7.52	7.02-7.52	7.17, 7.30, 7.40 7.51, 8.11	7.17, 7.30, 7.40 7.51, 8.11	7.23, 7.32, 7.43 7.60, 8.12	7.23, 7.32, 7.43 7.56, 8.12

Tabla 4.24. Continuación.

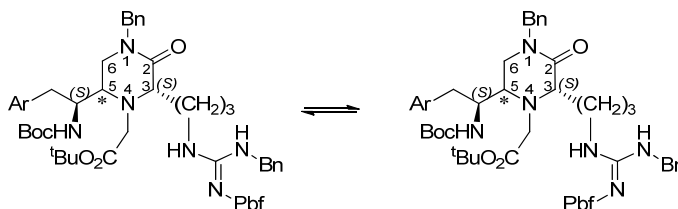


	(R)-106c		(S)-106c		(R)-109c		(S)-109c	
Proporción	5	2	5	3	2	1	3	1
¹³ C RMN ^f								
C ₂	170.1	170.1	171.8	171.8	170.7	170.7	171.7	171.7
C ₃	61.4	61.1	63.6	63.6	61.9	62.0	63.5	64.0
C ₅	55.0	55.0	63.6	63.6	55.7	55.6	63.5	63.5
C ₆	45.1	44.7	44.9	44.9	45.9	45.9	44.9	44.9
1-Bn	49.6, 138.0	49.6, 138.0	49.8, 138.4	49.9, 138.4	50.3, 138.7	50.3, 138.7	49.9, 138.4	49.9, 138.4
C ₃ -(CH ₂) ₃	26.2, 27.6, 40.5	26.2, 27.6, 40.5	26.4, 32.1, 41.6	26.4, 32.1, 41.6	27.0, 28.0, 41.6	27.0, 28.0, 41.6	26.4, 30.1, 41.6	26.4, 30.2, 41.6
4-Bn	51.0, 138.9	51.0, 138.9	61.7, 139.8	61.7, 139.8	51.8, 139.3	51.8, 139.3	61.9, 139.6	61.9, 139.6
C ₅ -CH	52.6	52.4	54.7	54.7	51.4	51.5	52.7	52.7
C ₅ -CH-CH ₂	37.6	37.7	36.3	36.3	25.6	25.6	26.2	26.2
NHC(NHBn)=N								
C	155.3	155.3	155.9	156.5	156.5	156.5	156.5	156.5
Bn	45.1, 138.1	50.8, 138.1	44.9, 139.9	51.0, 139.9	45.3, 138.8	51.8, 138.8	45.3, 139.6	51.0, 139.6
Ar	139.5	139.5	140.4	140.4	118.7, 131.9 136.3	118.6, 131.9 136.3	118.9, 131.8 136.3	118.9, 131.8 136.3,

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-100% de A en B en 30 min.

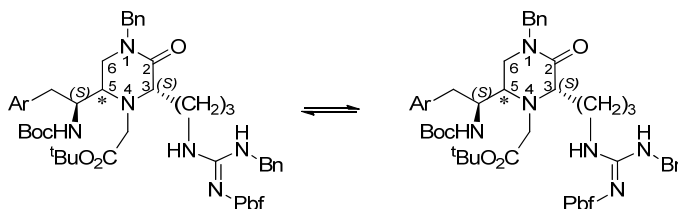
^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-95% de A en B en 15 min. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y a CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.25. Datos analíticos y espectroscópicos de las 4-acetato-*terc*-butil 1-bencil-2-oxopiperazinas benciladas en el guanidino **111c** y **113c**^a.



	(R)-111c		(S)-111c		(R)-113c		(S)-113c	
Proporción	5	1	3	1	5	1	3	1
Ar	Ph		Ph		1-Boc-Ind		1-Boc-Ind	
Conf. C ₅	(R)		(S)		(R)		(S)	
F. Molecular ^b	C ₅₄ H ₇₂ N ₆ O ₈ S		C ₅₄ H ₇₂ N ₆ O ₈ S		C ₆₁ H ₈₁ N ₇ O ₁₀ S		C ₆₁ H ₈₁ N ₇ O ₁₀ S	
M. Molecular	965.3		965.3		1104.4		1104.4	
ESI-MS [M+1] ⁺	966.2		966.2		1105.3		1105.3	
Rendimiento (%)	14		15		16		20	
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^c	12.8	12.5	12.28	12.83	20.05	19.34	21.04	21.82
<i>t</i> _R (min) (A:B) ^d	4.49	4.27	4.73	4.94	8.38	8.00	8.29	8.64
¹ H-RMN ^e								
3-H	3.36	3.36	3.51	3.51	3.34	3.34	3.54	3.54
5-H	3.40	3.40	3.24	3.24	3.49	3.49	3.28	3.28
6-H	3.26, 3.42	3.26, 3.42	3.40	3.40	3.30, 3.41	3.30, 3.41	3.48	3.48
1-CH ₂ (Bn)	4.36, 4.83	4.36, 4.85	4.52, 4.70	4.56-4.66	4.40, 4.83	4.35, 4.85	4.58, 4.70	4.52, 4.70
3-(CH ₂) ₃	1.85, 3.36, 3.48	1.85, 3.36, 3.48	1.77, 3.30	1.77, 3.30	1.90, 3.38, 3.47	1.90, 3.38, 3.47	1.79, 1.81, 3.31	1.79, 1.81, 3.31
4-(CH ₂ -CO ₂ ^t Bu)	1.45, 3.14, 3.62	1.45, 3.16, 3.63	1.46, 3.54, 3.68	1.45, 3.59, 3.63	1.46, 3.20, 3.65	1.44, 3.22, 3.65	1.46, 3.60, 3.70	1.45, 3.60, 3.70
5-CH	3.82	3.82	3.88	3.88	3.84-3.95	3.90	4.02	4.02
5-CH-CH ₂	2.64, 3.48	2.58, 3.46	2.54, 3.03	2.54, 3.03	2.79, 3.57	2.79, 3.57	2.70, 3.15	2.70, 3.15
NH-Boc	5.86(d, J=9.5)	5.85(d, J=9.5)	6.08(d, J=8.5)	6.08(d, J=8.5)	5.96(d, J=9.5)	5.94(d, J=9.5)	6.14(d, J=8)	6.14
NHC(NHBn)=N								
NH	7.09-7.39	7.09-7.39	7.10-7.37	7.10-7.37	7.09-7.40	7.09-7.40	7.19	7.19
CH ₂ (Bn)	4.43, 4.46	4.67, 4.75	4.44	4.48	4.38, 4.46	4.68, 4.77	4.42	4.60, 4.66
<i>J</i> _{NH,CH₂} (Bn)	6	-	5.5	-	6	-	5.5	-
Ar	7.09-7.39	7.09-7.39	7.10-7.37	7.10-7.37	7.17, 7.28, 7.50 7.61, 8.11	7.17, 7.28, 7.47 7.55, 8.11	7.23, 7.39, 7.50 7.59, 8.11	7.23, 7.39, 7.50 7.59, 8.11

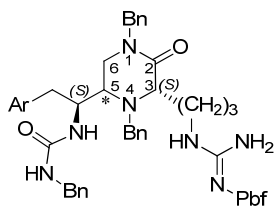
Tabla 4.25. Continuación



	(R)-111c		(S)-111c		(R)-113c		(S)-113c	
Proporción	5	1	3	1	5	1	3	1
¹³ C RMN ^f								
C ₂	170.1	169.9	171.1	171.1	170.5	170.4	170.4	170.4
C ₃	64.4	64.4	64.8	64.8	65.0	65.0	64.1	64.1
C ₅	55.0	-	60.7	60.7	55.5	55.5	60.4	60.4
C ₆	45.4	45.4	44.9	44.9	46.2	46.2	44.4	44.4
1-Bn	49.6, 137.9	49.6, 137.9	50.0, 138.4	50.0, 138.4	50.3, 138.8	50.3, 138.8	49.6, 137.8	49.6, 137.8
C ₃ -(CH ₂) ₃	26.6, 28.0, 41.2	26.6, 28.0, 41.2	26.3, 32.1, 42.0	26.3, 32.1, 42.0	27.6, 41.8	27.6, 41.8	25.8, 31.3, 41.4	25.8, 31.3, 41.4
4-(CH ₂ -CO ₂ ^t Bu)	27.6, 50.9	27.6, 50.7	28.8, 56.2	28.8, 56.2	28.3, 51.6	28.3, 51.6	27.6, 56.1	27.6, 56.1
	80.9, 170.4	80.9, 170.4	81.7, 171.2	81.7, 171.2	81.7, 171.0	81.7, 171.0	81.2, 170.6	81.2, 170.6
C ₅ -CH	52.6	52.6	53.9	53.9	52.0	52.0	51.5	51.5
C ₅ -CH-CH ₂	37.4	37.4	35.3	35.3	27.2	27.2	24.7	24.7
NHC(NHBn)=N								
C	153.9	153.9	156.0	156.1	156.5	156.5	155.8	155.8
Bn	44.7, 137.9	50.9, 137.9	44.9, 138.4	52.6, 138.4	45.4, 138.8	51.6, 138.8	44.9, 137.8	49.6, 137.8
Ar	139.7	139.7	140.7	140.7	118.6, 131.9	118.8, 131.9	118.3, 131.1	118.3, 131.1
					136.4	136.4	135.8	135.8

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-100% de A en B en 30 min. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 80-95% de A en B en 15 min. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y a CH aromáticos no están incluidas.

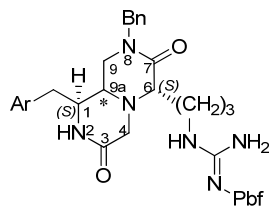
Tabla 4.26. Datos analíticos y espectroscópicos de las bencilureas derivadas de 1,4-bencil-2-oxopiperazinas portadoras de la cadena lateral de arginina **114c** y **115c**^a.



	(R)-114c	(S)-114c	(R)-115c	(S)-115c
Ar	Ph	Ph	1-Boc-Ind	1-Boc-Ind
Conf. C ₅	(R)	(S)	(R)	(S)
F. Molecular ^b	C ₅₁ H ₆₁ N ₇ O ₅ S	C ₅₁ H ₆₁ N ₇ O ₅ S	C ₅₃ H ₆₂ N ₈ O ₅ S	C ₅₃ H ₆₂ N ₈ O ₅ S
M. Molecular	884.1	884.1	923.2	923.2
ESI-MS [M+1] ⁺	885.0	885.0	924.1	924.2
Rendimiento (%)	70	85	50	50
[α] _D	-14 (c 1.3, CH ₂ Cl ₂)	+9.9 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	-13 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	+11 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)
t _R (min) (A:B) ^c	8.12	11.52	11.23	13.75
t _R (min) (A:B) ^d	3.87	4.19	4.33	4.53
¹ H-RMN ^e				
3-H	3.12	3.10	3.11	3.10
5-H	3.50	3.10	3.53	3.12
6-H	3.38, 3.63	3.45	3.39, 3.65	3.47
1-CH ₂ (Bn)	4.53, 4.68	4.51, 4.68	4.51, 4.69	4.46, 4.71
3-(CH ₂) _n	1.79, 3.07	1.54, 1.70	1.79, 3.06	1.30, 1.54, 1.73
4-CH ₂ (Bn)	3.48, 4.20	3.75, 3.99	3.49, 4.23	3.74, 3.96
5-CH	4.28	4.15	4.40	4.24
5-CH-CH ₂	2.76, 3.49	2.56, 2.99	2.98, 3.53	2.77, 3.12
NHCONH	5.59, 5.77	5.75, 5.97	5.55, 5.79	5.70, 6.03
Bn (Urea)	4.18	4.18, 4.27	4.20	4.26, 4.30
NHC(NH ₂)=N	6.50	6.40	6.52	6.45
J _{5-H,6-H}	4.5 y 12.5	8	4.5 y 12.5	-
Ar	7.04-7.43	7.07-7.45	6.91, 7.05, 7.18 7.39, 7.49, 10.08	6.96, 7.02, 7.08 7.37, 7.53, 10.00
¹³ C RMN ^f				
C ₂	171.0	172.1	171.0	172.1
C ₃	62.1	63.8	62.2	63.6
C ₅	55.8	63.6	55.5	62.9
C ₆	46.2	45.8	46.2	45.9
1-Bn	50.4, 138.7	49.8, 138.6	50.4, 138.8	49.7, 138.7
C ₃ -(CH ₂) ₃	27.1, 28.7, 41.3	26.9, 31.4, 41.0	28.1, 28.8, 41.2	27.0, 31.1, 40.9
4-Bn	51.8, 139.6	63.1, 140.0	51.9, 139.6	62.9, 140.0
C ₅ -CH	52.5	54.9	51.4	54.1
C ₅ -CH-CH ₂	38.6	38.4	27.2	28.3
NHCONH	158.6	159.9	158.9	159.2
Bn (Urea)	44.1, 141.8	44.2, 141.6	44.1, 141.8	44.3, 141.7
NHC(NH ₂)=N	157.4	157.5	157.4	157.5
Ar	140.3	140.0	112.1, 129.0 137.5	112.1, 129.1 137.5

^aTodos los compuestos fueron aislados como sólidos amorfos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 50-100% de A en B en 30 min para **115c** y gradiente 60-100% de A en B en 30 min para **114c**. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 50-95% de A en B en 5 min para **115c** y gradiente 60-95% de A en B en 5 min para **114c**. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. Las señales correspondientes a grupos protectores no están incluidas. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y CH aromáticos no están incluidas.

Tabla 4.27. Datos analíticos y espectroscópicos más significativos de las 3,7-dioxoocta-hidro-1*H*-pirazino[1,2-*a*]pirazinas **116c** y **117c**^a.



	(<i>R</i>)- 116c	(<i>S</i>)- 116c	(<i>R</i>)- 117c	(<i>S</i>)- 117c
Ar	Ph	Ph	1-Ind	1-Ind
Conf. C _{9a}	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)
F. Molecular ^b	C ₃₈ H ₄₈ N ₆ O ₅ S	C ₃₈ H ₄₈ N ₆ O ₅ S	C ₄₀ H ₄₉ N ₇ O ₅ S	C ₄₀ H ₄₉ N ₇ O ₅ S
M. Molecular	700.9	700.9	739.9	739.9
ESI-MS [M+1] ⁺	701.6	701.6	740.8	740.8
Rendimiento (%)	91	96	60	60
[α] _D	+24 (c 1.4, CH ₂ Cl ₂)	-9.6 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)	+4.6 (c 1.1, CH ₂ Cl ₂)	-3.5 (c 1.2, CH ₂ Cl ₂)
t _R (min) (A:B) ^c	5.04	5.20	8.48	8.72
t _R (min) (A:B) ^d	1.87	1.94	2.96	2.86
¹ H-RMN ^e				
1-H	4.05	3.52	4.16	3.54
2-H	6.34	6.78	6.32	6.75
4-H	3.30	2.80, 3.29	3.29	2.84, 3.30
6-H	2.99	3.08	2.99	3.08
9-H	3.30, 3.72	3.31	3.36, 3.73	3.32, 3.37
9a-H	3.45	2.77	3.69	2.89
1-CH ₂	2.67, 2.77	2.79, 2.99	2.87	2.94, 3.13
5-(CH ₂) ₃	1.59, 1.75, 3.20	1.49, 1.69, 1.88 3.22	1.70, 1.80, 3.18	1.51, 1.69, 1.87 3.22
8-CH ₂ (Bn)	4.49, 4.78	4.46, 4.65	4.58, 4.68	4.48, 4.58
NHC(NH ₂)=N	6.51	6.52	6.53	6.53
J _{1,9a}	4.5	-	4	-
J _{9,9a}	4.5 y 11	-	3.5 y 11	-
Ar	7.15-7.40	7.10-7.39	7.01, 7.11, 7.16 7.39, 7.57, 10.18	7.00, 7.10, 7.17 7.40, 7.52, 10.16
¹³ C-RMN ^f				
C ₁	55.7	55.7	54.7	55.5
C ₃	168.0	167.7	168.0	167.6
C ₄	52.6	53.5	52.8	53.4
C ₆	64.6	65.7	64.9	66.0
C ₇	169.9	168.5	170.2	168.7
C ₉	40.5	47.8	40.9	48.4
C _{9a}	47.3	55.8	47.7	56.7
C ₁ -CH ₂	38.0	40.3	27.6	30.7
C ₅ -(CH ₂) ₃	27.3, 28.9, 41.1	25.6, 27.3, 41.5	28.3, 29.2, 41.4	25.9, 27.5, 41.7
8-Bn	50.3, 138.4	50.3, 138.1	50.7, 138.6	50.6, 138.2
NHC(NH ₂)=N	157.3	157.3	157.5	157.4
Ar	137.4	137.7	110.3, 128.3 137.9	110.6, 128.6 137.8

^aTodos los compuestos fueron aislados como sirupos. ^bAnálisis elemental satisfactorio para C, H, N. ^cHPLC (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-100% de A en B en 30 min para **116** y gradiente 50-100% de A en B en 30 min para **117**. ^dHPLC-MS (columna Sunfire C₁₈), gradiente 60-95% de A en B en 5 min para **116** y gradiente 50-95% de A en B en 5 min para **117**. ^eEspectros registrados a 400 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos COSY y HSQC. ^fEspectros registrados a 100 MHz en (CD₃)₂CO, asignados con la ayuda de experimentos HSQC y HMBC. Las señales correspondientes a grupos protectores y CH aromáticos no están incluidas.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Di Cera, E. Thrombin. *Mol. Aspects Med.*, **2008**, 29, 203-254.
2. Macfarlane, S. R.; Seatter, M. J.; Kanke, T.; Hunter, G. D.; Plevin, R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.*, **2001**, 53, 245-282.
3. Martorell, L.; Martínez-González, J.; Rodríguez, C.; Gentile, M.; Calvayrac, O.; Badimon, L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb. Haemostasis*, **2008**, 99, 305-315.
4. Ossovskaya, V. S.; Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.*, **2004**, 84, 579-621.
5. Sokolova, E.; Reiser, G. Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases. *Thromb. Haemostasis*, **2008**, 100, 576-581.
6. Luo, W.; Wang, Y.; Reiser, G. The role of thrombin and thrombin receptors in the brain. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 8, pp 133-159.
7. Luo, W.; Wang, Y.; Reiser, G. Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res. Rev.*, **2007**, 56, 331-345.
8. Steinhoff, M.; Buddenkotte, J.; Shpacovitch, V.; Rattenholl, A.; Moormann, C.; Vergnolle, N.; Luger, T. A.; Hollenberg, M. D. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.*, **2005**, 26, 1-43.
9. Ramachandran, R.; El-Daly, M.; Saifeddine, M.; Hollenberg, M. D. Thrombin: To PAR or not to PAR, and the regulation of inflammation. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 2, pp 19-46.
10. Pagel, C. N.; Song, S. J.; Loh, L. H.; Tudor, E. M.; Murray-Rust, T. A.; Pike, R. N.; Mackie, E. J. Thrombin-stimulated growth factor and cytokine expression in osteoblasts is mediated by protease-activated receptor-1 and prostanoids. *Bone*, **2009**, 44, 813-821.
11. Arora, P.; Ricks, T. K.; Trejo, J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J. Cell Sci.*, **2007**, 120, 921-928.
12. Camerer, E. Protease signaling in tumor progression. *Thromb. Res.*, **2007**, 120 Suppl 2, S75-S81.

13. Borensztajn, K. S.; Spek, C. A. Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, **2008**, *36*, 137-147.
14. Kobrinsky, B.; Karpatkin, S. The role of thrombin in tumor biology. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 9, pp 161-172.
15. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, **2000**, *407*, 258-264.
16. Proteinase-activated receptors. In *The Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction*; 5th ed.; Watling, K. J., Ed.; SigmaAldrich Research Biotechnology: Natick, **2006**, pp 210-211.
17. García-López, M. T.; Gutiérrez-Rodríguez, M.; Herranz, R. Thrombin-Activated Receptors: Promising Targets for Cancer Therapy? *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 109-128.
18. Vu, T. K.; Hung, D. T.; Wheaton, V. I.; Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, **1991**, *64*, 1057-1068.
19. Blackhart, B. D.; Ruslim-Litrus, L.; Lu, C. C.; Alves, V. L.; Teng, W.; Scarborough, R. M.; Reynolds, E. E.; Oksenberg, D. Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide. *Mol. Pharm.*, **2000**, *58*, 1178-1187.
20. Seeley, S.; Covic, L.; Jacques, S. L.; Sudmeier, J.; Baleja, J. D.; Kuliopulos, A. Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding. *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 1033-1041.
21. Derian, C. K.; Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Andrade-Gordon, P. Therapeutic potential of protease-activated receptor-1 antagonists. *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2003**, *12*, 209-221.
22. Trejo, J. Regulation of thrombin receptor signaling. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 3, pp 47-61.
23. Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S.; Farese, R. V., Jr.; Tam, C.; Coughlin, S. R. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, **1998**, *394*, 690-694.

24. O'Brien, P. J.; Prevost, N.; Molino, M.; Hollinger, M. K.; Woolkalis, M. J.; Woulfe, D. S.; Brass, L. F. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 13502-13509.
25. Schaffner, F.; Ruf, W. Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2008**, 34, 147-153.
26. Camerer, E.; Kataoka, H.; Kahn, M.; Lease, K.; Coughlin, S. R. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 16081-16087.
27. Riewald, M. Thrombin and activated protein C: Integrated to regulate vascular physiology. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 4, pp 63-80.
28. Cheng, T.; Liu, D.; Griffin, J. H.; Fernández, J. A.; Castellino, F.; Rosen, E. D.; Fukudome, K.; Zlokovic, B. V. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.*, **2003**, 9, 338-342.
29. Mannaioni, G.; Orr, A. G.; Hamill, C. E.; Yuan, H.; Pedone, K. H.; McCoy, K. L.; Berlinguer Palmini, R.; Junge, C. E.; Lee, C. J.; Yepes, M.; Hepler, J. R.; Traynelis, S. F. Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 20600-20611.
30. Hollenberg, M. D.; Oikonomopoulou, K.; Hansen, K. K.; Saifeddine, M.; Ramachandran, R.; Diamandis, E. P. Kallikreins and proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of inflammatory diseases and cancer. *Biol. Chem.*, **2008**, 389, 643-651.
31. Boire, A.; Covic, L.; Agarwal, A.; Jacques, S.; Sherifi, S.; Kuliopulos, A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, **2005**, 120, 303-313.
32. Lourbakos, A.; Potempa, J.; Travis, J.; D'Andrea, M. R.; Andrade-Gordon, P.; Santulli, R.; Mackie, E. J.; Pike, R. N. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect. Immun.*, **2001**, 69, 5121-5130.

33. Lourbakos, A.; Yuan, Y. P.; Jenkins, A. L.; Travis, J.; Andrade-Gordon, P.; Santulli, R.; Potempa, J.; Pike, R. N. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood*, **2001**, *97*, 3790-3797.
34. Rana, T.; Misra, S.; Mittal, M. K.; Farrow, A. L.; Wilson, K. T.; Linton, M. F.; Fazio, S.; Willis, I. M.; Chaudhuri, G. Mechanism of Down-regulation of RNA Polymerase III-transcribed Non-coding RNA Genes in Macrophages by *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 6614-6626.
35. Nguyen, Q. D.; Faivre, S.; Bruyneel, E.; Rivat, C.; Seto, M.; Endo, T.; Mareel, M.; Emami, S.; Gespach, C. RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of G α subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion. *FASEB J.*, **2002**, *16*, 565-576.
36. McLaughlin, J. N.; Shen, L.; Holinstat, M.; Brooks, J. D.; Dibenedetto, E.; Hamm, H. E. Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 25048-25059.
37. Gavard, J.; Gutkind, J. S. Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from G α 12/13 and G α 11/q. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 29888-29896.
38. De Vries, L.; Palmier, C.; Finana, F.; Le Grand, B.; Perez, M.; Cussac, D. Pharmacological characterization of protease activated receptor-1 by a serum responsive element-dependent reporter gene assay: major role of calmodulin. *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *71*, 1449-1458.
39. Huang, J. S.; Dong, L.; Kozasa, T.; Le Breton, G. C. Signaling through G(α)13 switch region I is essential for protease-activated receptor 1-mediated human platelet shape change, aggregation, and secretion. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 10210-10222.
40. Vouret-Craviari, V.; Boquet, P.; Pouyssegur, J.; Van Obberghen-Schilling, E. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol. Biol. Cell*, **1998**, *9*, 2639-2653.
41. Nguyen, Q. D.; De Wever, O.; Bruyneel, E.; Hendrix, A.; Xie, W. Z.; Lombet, A.; Leibl, M.; Mareel, M.; Gieseler, F.; Bracke, M.; Gespach, C. Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene*, **2005**, *24*, 8240-8251.

42. Hatziapostolou, M.; Polytarchou, C.; Panutsopoulos, D.; Covic, L.; Tsiachlis, P. N. Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 1851-1861.
43. Furuhashi, I.; Abe, K.; Sato, T.; Inoue, H. Thrombin-stimulated proliferation of cultured human synovial fibroblasts through proteolytic activation of proteinase-activated receptor-1. *J. Pharmacol. Sci.*, **2008**, *108*, 104-111.
44. Palma-Nicolas, J. P.; López, E.; López-Colomé, A. M. PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci. Rep.*, **2008**, *28*, 307-317.
45. Chiu, Y. C.; Fong, Y. C.; Lai, C. H.; Hung, C. H.; Hsu, H. C.; Lee, T. S.; Yang, R. S.; Fu, W. M.; Tang, C. H. Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C α , c-Src, NF-kappa B and p300 pathway. *Mol. Immunol.*, **2008**, *45*, 1587-1599.
46. Huang, Y. L.; Shi, G. Y.; Lee, H.; Jiang, M. J.; Huang, B. M.; Wu, H. L.; Yang, H. Y. Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, **2009**, *21*, 954-968.
47. Arora, P.; Cuevas, B. D.; Russo, A.; Johnson, G. L.; Trejo, J. Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene*, **2008**, *27*, 4434-4445.
48. Faivre, S.; Regnault, K.; Bruyneel, E.; Nguyen, Q. D.; Mareel, M.; Emami, S.; Gespach, C. Suppression of cellular invasion by activated G-protein subunits G α o, G α i1, G α i2, and G α i3 and sequestration of G β γ . *Mol. Pharm.*, **2001**, *60*, 363-372.
49. Wang, H.; Uhl, J. J.; Stricker, R.; Reiser, G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2002**, *283*, C1351-C1364.
50. Wolfe, B. L.; Marchese, A.; Trejo, J. Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J. Cell Biol.*, **2007**, *177*, 905-916.
51. Ishii, K.; Chen, J.; Ishii, M.; Koch, W. J.; Freedman, N. J.; Lefkowitz, R. J.; Coughlin, S. R. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 1125-1130.

52. Paing, M. M.; Stutts, A. B.; Kohout, T. A.; Lefkowitz, R. J.; Trejo, J. beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 1292-1300.
53. Sambrano, G. R.; Coughlin, S. R. The carboxyl tail of protease-activated receptor-1 is required for chemotaxis. Correlation of signal termination and directional migration. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 20178-20184.
54. Trejo, J.; Hammes, S. R.; Coughlin, S. R. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, 95, 13698-13702.
55. Lyman, G. H.; Khorana, A. A.; Kuderer, N. M.; Lee, A. Y. Cancer and thrombosis: back to the future renewed interest in an old problem. *Cancer Investig.*, **2009**, 27, 472-473.
56. Shen, V. S.; Pollak, E. W. Fatal pulmonary embolism in cancer patients: is heparin prophylaxis justified? *South. Med. J.*, **1980**, 73, 841-843.
57. Svendsen, E.; Karwinski, B. Prevalence of pulmonary embolism at necropsy in patients with cancer. *J. Clin. Pathol.*, **1989**, 42, 805-809.
58. Rickles, F. R.; Edwards, R. L. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood*, **1983**, 62, 14-31.
59. Petralia, G. A.; Kakkar, A. K. Anti-thrombotic therapy in cancer patients. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 11, pp 189-203.
60. Prandoni, P.; Lensing, A. W.; Buller, H. R.; Cogo, A.; Prins, M. H.; Cattelan, A. M.; Cuppini, S.; Noventa, F.; ten Cate, J. W. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, **1992**, 327, 1128-1133.
61. Sørensen, H. T.; Mellekjaer, L.; Olsen, J. H.; Baron, J. A. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.*, **2000**, 343, 1846-1850.
62. Kakkar, A. K. An expanding role for antithrombotic therapy in cancer patients. *Cancer Treat. Rev.*, **2003**, 29 Suppl 2, 23-26.
63. Nierodzik, M. L.; Karparkin, S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, **2006**, 10, 355-362.
64. Zacharski, L. R.; Henderson, W. G.; Rickles, F. R.; Forman, W. B.; Cornell, C. J., Jr.; Forcier, R. J.; Edwards, R. L.; Headley, E.; Kim, S. H.; O'Donnell, J. F.; et al.

- Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer*, **1984**, *53*, 2046-2052.
65. Lebeau, B.; Chastang, C.; Brechot, J. M.; Capron, F.; Dautzenberg, B.; Delaisements, C.; Mornet, M.; Brun, J.; Hurdebourcq, J. P.; Lemarie, E. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group. *Cancer*, **1994**, *74*, 38-45.
 66. Altinbas, M.; Coskun, H. S.; Er, O.; Ozkan, M.; Eser, B.; Unal, A.; Cetin, M.; Soyuer, S. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J. Thromb. Haemost.*, **2004**, *2*, 1266-1271.
 67. Kakkar, A. K.; Levine, M. N.; Kadziola, Z.; Lemoine, N. R.; Low, V.; Patel, H. K.; Rustin, G.; Thomas, M.; Quigley, M.; Williamson, R. C. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 1944-1948.
 68. Klerk, C. P.; Smorenburg, S. M.; Otten, H. M.; Lensing, A. W.; Prins, M. H.; Piovella, F.; Prandoni, P.; Bos, M. M.; Richel, D. J.; van Tienhoven, G.; Buller, H. R. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 2130-2135.
 69. Lee, A. Y.; Rickles, F. R.; Julian, J. A.; Gent, M.; Baker, R. I.; Bowden, C.; Kakkar, A. K.; Prins, M.; Levine, M. N. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 2123-2129.
 70. Leshchenko Iu, M.; Miasoiedov, D. V.; Oliinichenko, H. P.; Koshel, K. V.; Iatsenko, S. M. The effect of low-molecular-weight heparin on the late follow-up results of the combined and complex treatment of patients with rectal cancer. *Klin. Khir.*, **2007**, 21-24.
 71. Bobek, V.; Boubelik, M.; Fiserova, A.; L'Uptovcova, M.; Vannucci, L.; Kacprzak, G.; Kolodziej, J.; Majewski, A. M.; Hoffman, R. M. Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer*, **2005**, *47*, 215-223.
 72. Salah, Z.; Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Uziely, B.; Cohen, I.; Turn, H.; Perez, T.; Bar-Shavit, R. The role of thrombin and its receptors in epithelial malignancies:

- Lessons from a transgenic mouse model and transcriptional regulation. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 10, pp 173-188.
73. Tellez, C.; Bar-Eli, M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene*, **2003**, *22*, 3130-3137.
74. Granovsky-Grisaru, S.; Zaidoun, S.; Grisaru, D.; Yekel, Y.; Prus, D.; Beller, U.; Bar-Shavit, R. The pattern of Protease Activated Receptor 1 (PAR1) expression in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **2006**, *103*, 802-806.
75. Even-Ram, S.; Uziely, B.; Cohen, P.; Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Ginzburg, Y.; Reich, R.; Vlodavsky, I.; Bar-Shavit, R. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.*, **1998**, *4*, 909-914.
76. Cooper, C. R.; Chay, C. H.; Gendernalik, J. D.; Lee, H. L.; Bhatia, J.; Taichman, R. S.; McCauley, L. K.; Keller, E. T.; Pienta, K. J. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer*, **2003**, *97*, 739-747.
77. Yuan, T. C.; Lin, M. F. Protease-activated receptor 1: a role in prostate cancer metastasis. *Clin. Prostate Cancer*, **2004**, *3*, 189-191.
78. Black, P. C.; Mize, G. J.; Karlin, P.; Greenberg, D. L.; Hawley, S. J.; True, L. D.; Vessella, R. L.; Takayama, T. K. Overexpression of protease-activated receptors-1, -2, and -4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate*, **2007**, *67*, 743-756.
79. Zhang, X.; Wang, W.; True, L. D.; Vessella, R. L.; Takayama, T. K. Protease-activated receptor-1 is upregulated in reactive stroma of primary prostate cancer and bone metastasis. *Prostate*, **2009**, *69*, 727-736.
80. Rudroff, C.; Seibold, S.; Kaufmann, R.; Zetina, C. C.; Reise, K.; Schafer, U.; Schneider, A.; Brockmann, M.; Scheele, J.; Neugebauer, E. A. Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. *Clin. Exp. Metastasis*, **2002**, *19*, 181-189.
81. Grisaru-Granovsky, S.; Salah, Z.; Maoz, M.; Pruss, D.; Beller, U.; Bar-Shavit, R. Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int. J. Cancer*, **2005**, *113*, 372-378.
82. Darmoul, D.; Gratio, V.; Devaud, H.; Lehy, T.; Laburthe, M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell

- proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am. J. Pathol.*, **2003**, *162*, 1503-1513.
83. Jin, E.; Fujiwara, M.; Pan, X.; Ghazizadeh, M.; Arai, S.; Ohaki, Y.; Kajiwara, K.; Takemura, T.; Kawanami, O. Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas. *Cancer*, **2003**, *97*, 703-713.
 84. Ghio, P.; Cappia, S.; Selvaggi, G.; Novello, S.; Lausi, P.; Zecchina, G.; Papotti, M.; Borasio, P.; Scagliotti, G. V. Prognostic role of protease-activated receptors 1 and 4 in resected stage IB non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, **2006**, *7*, 395-400.
 85. Zhang, X.; Hunt, J. L.; Landsittel, D. P.; Muller, S.; Adler-Storthz, K.; Ferris, R. L.; Shin, D. M.; Chen, Z. G. Correlation of protease-activated receptor-1 with differentiation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck and its implication in lymph node metastasis. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 8451-8459.
 86. Veiga, C. D.; Carneiro-Lobo, T. C.; Coelho, C. J.; Carvalho, S. M.; Maia, R. C.; Vasconcelos, F. C.; Abdelhay, E.; Mencalha, A. L.; Ferreira, A. F.; Castro, F. A.; Monteiro, R. Q. Increased expression of protease-activated receptor 1 (PAR-1) in human leukemias. *Blood Cells Mol. Dis.*, **2011**, *46*, 230-234.
 87. D'Andrea, M. R.; Derian, C. K.; Santulli, R. J.; Andrade-Gordon, P. Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am. J. Pathol.*, **2001**, *158*, 2031-2041.
 88. Martin, C. B.; Mahon, G. M.; Klinger, M. B.; Kay, R. J.; Symons, M.; Der, C. J.; Whitehead, I. P. The thrombin receptor, PAR-1, causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene*, **2001**, *20*, 1953-1963.
 89. Salah, Z.; Maoz, M.; Pokroy, E.; Lotem, M.; Bar-Shavit, R.; Uziely, B. Protease-activated receptor-1 (hPar1), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol. Cancer Res.*, **2007**, *5*, 229-240.
 90. Villares, G. J.; Zigler, M.; Wang, H.; Melnikova, V. O.; Wu, H.; Friedman, R.; Leslie, M. C.; Vivas-Mejia, P. E.; López-Berestein, G.; Sood, A. K.; Bar-Eli, M. Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 9078-9086.

91. Kepner, N.; Lipton, A. A mitogenic factor for transformed fibroblasts from human platelets. *Cancer Res.*, **1981**, *41*, 430-432.
92. Möhle, R.; Green, D.; Moore, M. A.; Nachman, R. L.; Rafii, S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, *94*, 663-668.
93. Li, J. J.; Huang, Y. Q.; Basch, R.; Karpatkin, S. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb. Haemostasis*, **2001**, *85*, 204-206.
94. Nieswandt, B.; Hafner, M.; Echtenacher, B.; Mannel, D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 1295-1300.
95. Beaulieu, L. M.; Church, F. C. Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Exp. Cell Res.*, **2007**, *313*, 677-687.
96. Page-McCaw, A.; Ewald, A. J.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 221-233.
97. Ala-aho, R.; Kahari, V. M. Collagenases in cancer. *Biochimie*, **2005**, *87*, 273-286.
98. Blackburn, J. S.; Brinckerhoff, C. E. Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **2008**, *173*, 1736-1746.
99. Blackburn, J. S.; Rhodes, C. H.; Coon, C. I.; Brinckerhoff, C. E. RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 10849-10858.
100. Nguyen, N.; Kuliopulos, A.; Graham, R. A.; Covic, L. Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 2658-2665.
101. Agarwal, A.; Covic, L.; Sevigny, L. M.; Kaneider, N. C.; Lazarides, K.; Azabdaftari, G.; Sharifi, S.; Kuliopulos, A. Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*, 2746-2757.
102. Trivedi, V.; Boire, A.; Tchernychev, B.; Kaneider, N. C.; Leger, A. J.; O'Callaghan, K.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates

- thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*, **2009**, *137*, 332-343.
103. Darmoul, D.; Gratio, V.; Devaud, H.; Peiretti, F.; Laburthe, M. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cancer Res.*, **2004**, *2*, 514-522.
104. Yin, Y. J.; Katz, V.; Salah, Z.; Maoz, M.; Cohen, I.; Uziely, B.; Turm, H.; Grisaru-Granovsky, S.; Suzuki, H.; Bar-Shavit, R. Mammary gland tissue targeted overexpression of human protease-activated receptor 1 reveals a novel link to β -catenin stabilization. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 5224-5233.
105. Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Barzilay, O.; Yin, Y. J.; Prus, D.; Bar-Shavit, R. Protease activated receptor-1, PAR1, promotes placenta trophoblast invasion and β -catenin stabilization. *J. Cell. Physiol.*, **2009**, *218*, 512-521.
106. Salah, Z.; Maoz, M.; Cohen, I.; Pizov, G.; Pode, D.; Runge, M. S.; Bar-Shavit, R. Identification of a novel functional androgen response element within hPar1 promoter: implications to prostate cancer progression. *FASEB J.*, **2005**, *19*, 62-72.
107. Salah, Z.; Maoz, M.; Pizov, G.; Bar-Shavit, R. Transcriptional regulation of human protease-activated receptor 1: a role for the early growth response-1 protein in prostate cancer. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 9835-9843.
108. Salah, Z.; Haupt, S.; Maoz, M.; Baraz, L.; Rotter, V.; Peretz, T.; Haupt, Y.; Bar-Shavit, R. p53 controls hPar1 function and expression. *Oncogene*, **2008**, *27*, 6866-6874.
109. Tsopanoglou, N. E.; Pipili-Synetos, E.; Maragoudakis, M. E. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am. J. Pathol.*, **1993**, *264*, C1302-C1307.
110. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. The role of thrombin in angiogenesis. In *Thrombin: Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 6, pp 93-113.
111. Caunt, M.; Huang, Y. Q.; Brooks, P. C.; Karparkin, S. Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J. Thromb. Haemost.*, **2003**, *1*, 2097-2102.
112. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on

- endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 23969-23976.
113. Huang, Y. Q.; Li, J. J.; Hu, L.; Lee, M.; Karparkin, S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*, **2002**, 99, 1646-1650.
114. Caunt, M.; Hu, L.; Tang, T.; Brooks, P. C.; Ibrahim, S.; Karparkin, S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 4125-4132.
115. Zania, P.; Kritikou, S.; Flordellis, C. S.; Maragoudakis, M. E.; Tsopanoglou, N. E. Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease-activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, 318, 246-254.
116. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. Inhibition of angiogenesis by small-molecule antagonists of protease-activated receptor-1. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2007**, 33, 680-687.
117. Zania, P.; Gourni, D.; Aplin, A. C.; Nicosia, R. F.; Flordellis, C. S.; Maragoudakis, M. E.; Tsopanoglou, N. E. Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, 328, 378-389.
118. Strande, J. L.; Widlansky, M. E.; Tsopanoglou, N. E.; Su, J.; Wang, J.; Hsu, A.; Routhu, K. V.; Baker, J. E. Parstatin: a cryptic peptide involved in cardioprotection after ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **2009**, 83, 325-334.
119. Huang, H.; Vasilakis, P.; Zhong, X.; Shen, J. K.; Geronatsiou, K.; Papadaki, H.; Maragoudakis, M. E.; Gartaganis, S. P.; Viores, S. A.; Tsopanoglou, N. E. Parstatin suppresses ocular neovascularization and inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2010**, 51, 5825-5832.
120. Routhu, K. V.; Tsopanoglou, N. E.; Strande, J. L. Parstatin(1-26): the putative signal peptide of protease-activated receptor 1 confers potent protection from myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2010**, 332, 898-905.
121. Di Cera, E. Thrombin as an anticoagulant. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **2011**, 99, 145-184.

122. Gandhi, P. S.; Chen, Z.; Mathews, F. S.; Di Cera, E. Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 1832-1837.
123. Vu, T. K.; Wheaton, V. I.; Hung, D. T.; Charo, I.; Coughlin, S. R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, **1991**, *353*, 674-677.
124. Ayala, Y. M.; Cantwell, A. M.; Rose, T.; Bush, L. A.; Arosio, D.; Di Cera, E. Molecular mapping of thrombin-receptor interactions. *Proteins*, **2001**, *45*, 107-116.
125. Nieman, M. T.; Schmaier, A. H. Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 8603-8610.
126. Jacques, S. L.; LeMasurier, M.; Sheridan, P. J.; Seeley, S. K.; Kuliopulos, A. Substrate-assisted catalysis of the PAR1 thrombin receptor. Enhancement of macromolecular association and cleavage. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 40671-44068.
127. Myles, T.; Le Bonniec, B. F.; Stone, S. R. The dual role of thrombin's anion-binding exosite-I in the recognition and cleavage of the protease-activated receptor 1. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, *268*, 70-77.
128. Covic, L.; Gresser, A. L.; Kuliopulos, A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 5458-5467.
129. Bahou, W. F.; Kutok, J. L.; Wong, A.; Potter, C. L.; Collier, B. S. Identification of a novel thrombin receptor sequence required for activation-dependent responses. *Blood*, **1994**, *84*, 4195-4202.
130. Nanevycz, T.; Ishii, M.; Wang, L.; Chen, M.; Chen, J.; Turck, C. W.; Cohen, F. E.; Coughlin, S. R. Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 21619-21625.
131. Mathews, II; Padmanabhan, K. P.; Ganesh, V.; Tulinsky, A.; Ishii, M.; Chen, J.; Turck, C. W.; Coughlin, S. R.; Fenton, J. W., 2nd Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 3266-3279.
132. Gandhi, P. S.; Chen, Z.; Di Cera, E. Crystal structure of thrombin bound to the uncleaved extracellular fragment of PAR1. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 15393-15398.
133. Vouret-Craviari, V.; Van Obberghen-Schilling, E.; Rasmussen, U. B.; Pavirani, A.; Lecocq, J. P.; Pouyssegur, J. Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G

- protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **1992**, 3, 95-102.
134. Vouret-Craviari, V.; Van Obberghen-Schilling, E.; Scimeca, J. C.; Van Obberghen, E.; Pouyssegur, J. Differential activation of p44mapk (ERK1) by alpha-thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem. J.*, **1993**, 289 (Pt 1), 209-214.
 135. Feng, D. M.; Veber, D. F.; Connolly, T. M.; Condra, C.; Tang, M. J.; Nutt, R. F. Development of a potent thrombin receptor ligand. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4125-4130.
 136. Ceruso, M. A.; McComsey, D. F.; Leo, G. C.; Andrade-Gordon, P.; Addo, M. F.; Scarborough, R. M.; Oksenberg, D.; Maryanoff, B. E. Thrombin receptor-activating peptides (TRAPs): investigation of bioactive conformations via structure-activity, spectroscopic, and computational studies. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 2353-2371.
 137. Scarborough, R. M.; Naughton, M. A.; Teng, W.; Hung, D. T.; Rose, J.; Vu, T. K.; Wheaton, V. I.; Turck, C. W.; Coughlin, S. R. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 13146-13149.
 138. Chao, B. H.; Kalkunte, S.; Maraganore, J. M.; Stone, S. R. Essential groups in synthetic agonist peptides for activation of the platelet thrombin receptor. *Biochemistry*, **1992**, 31, 6175-6178.
 139. Vassallo, R. R., Jr.; Kieber-Emmons, T.; Cichowski, K.; Brass, L. F. Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 6081-6085.
 140. Sabo, T.; Gurwitz, D.; Motola, L.; Brodt, P.; Barak, R.; Elhanaty, E. Structure-activity studies of the thrombin receptor activating peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, 188, 604-610.
 141. Natarajan, S.; Riexinger, D.; Peluso, M.; Seiler, S. M. 'Tethered ligand' derived pentapeptide agonists of thrombin receptor: a study of side chain requirements for human platelet activation and GTPase stimulation. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1995**, 45, 145-151.
 142. Barry, G. D.; Le, G. T.; Fairlie, D. P. Agonists and antagonists of protease activated receptors (PARs). *Curr. Med. Chem.*, **2006**, 13, 243-265.
 143. Chen, C.; Maryanoff, B. E.; Andrade-Gordon, P. Thrombin receptor modulators: Medicinal chemistry, biological evaluation, and clinical applications. In *Thrombin*:

- Physiology and Disease*; Maragoudakis, M. E., Tsopanoglou, N. E., Eds.; Springer: New York, **2009**, Cap. 12, pp 205-236.
144. Mao, Y.; Jin, J.; Kunapuli, S. P. Characterization of a new peptide agonist of the protease-activated receptor-1. *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, *75*, 438-447.
 145. Hasan, A. A.; Warnock, M.; Nieman, M.; Srikanth, S.; Mahdi, F.; Krishnan, R.; Tulinsky, A.; Schmaier, A. H. Mechanisms of Arg-Pro-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2003**, *285*, H183-H193.
 146. Nieman, M. T.; Warnock, M.; Hasan, A. A.; Mahdi, F.; Lucchesi, B. R.; Brown, N. J.; Murphey, L. J.; Schmaier, A. H. The preparation and characterization of novel peptide antagonists to thrombin and factor VIIa and activation of protease-activated receptor 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *311*, 492-501.
 147. Nieman, M. T.; LaRusch, G.; Fang, C.; Zhou, Y.; Schmaier, A. H. Oral thrombostatin FM19 inhibits prostate cancer. *Thromb. Haemostasis*, **2010**, *104*, 1044-1048.
 148. Bernatowicz, M. S.; Klimas, C. E.; Hartl, K. S.; Peluso, M.; Allegretto, N. J.; Seiler, S. M. Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4879-4887.
 149. Kahn, M. L.; Nakanishi-Matsui, M.; Shapiro, M. J.; Ishihara, H.; Coughlin, S. R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.*, **1999**, *103*, 879-887.
 150. Quinton, T. M.; Kim, S.; Derian, C. K.; Jin, J.; Kunapuli, S. P. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 18434-18439.
 151. Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Andrade-Gordon, P.; Derian, C. K. Discovery of potent peptide-mimetic antagonists for the human thrombin receptor, protease-activated receptor-1 (PAR-1). *Curr. Med. Chem. - Cardiovasc. Hematol. Agents*, **2003**, *1*, 13-36.
 152. Zhang, H. C.; Derian, C. K.; Andrade-Gordon, P.; Hoekstra, W. J.; McComsey, D. F.; White, K. B.; Poulter, B. L.; Addo, M. F.; Cheung, W. M.; Damiano, B. P.; Oksenberg, D.; Reynolds, E. E.; Pandey, A.; Scarborough, R. M.; Maryanoff, B. E. Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (PAR-1) antagonists: potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 1021-1024.

153. Derian, C. K.; Maryanoff, B. E.; Andrade-Gordon, P.; Zhang, H. C. Design and evaluation of potent peptide-mimetic PAR-1 antagonists. *Drug Dev. Res.*, **2003**, *59*, 355-366.
154. Damiano, B. P.; Derian, C. K.; Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Gordon, P. A. RWJ-58259: a selective antagonist of protease activated receptor-1. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **2003**, *21*, 313-326.
155. Kato, Y.; Kita, Y.; Nishio, M.; Hirasawa, Y.; Ito, K.; Yamanaka, T.; Motoyama, Y.; Seki, J. In vitro antiplatelet profile of FR171113, a novel non-peptide thrombin receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, *384*, 197-202.
156. Kato, Y.; Kita, Y.; Hirasawa-Taniyama, Y.; Nishio, M.; Mihara, K.; Ito, K.; Yamanaka, T.; Seki, J.; Miyata, S.; Mutoh, S. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *473*, 163-169.
157. Barrow, J. C.; Nantermet, P. G.; Selnick, H. G.; Glass, K. L.; Ngo, P. L.; Young, M. B.; Pellicore, J. M.; Breslin, M. J.; Hutchinson, J. H.; Freidinger, R. M.; Condra, C.; Karczewski, J.; Bednar, R. A.; Gaul, S. L.; Stern, A.; Gould, R.; Connolly, T. M. Discovery and initial structure-activity relationships of trisubstituted ureas as thrombin receptor (PAR-1) antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2691-2696.
158. Nantermet, P. G.; Barrow, J. C.; Lundell, G. F.; Pellicore, J. M.; Rittle, K. E.; Young, M.; Freidinger, R. M.; Connolly, T. M.; Condra, C.; Karczewski, J.; Bednar, R. A.; Gaul, S. L.; Gould, R. J.; Prendergast, K.; Selnick, H. G. Discovery of a nonpeptidic small molecule antagonist of the human platelet thrombin receptor (PAR-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 319-323.
159. Suzuki, S.; Kotake, M.; Miyamoto, M.; Kawahara, T.; Kajiwara, A.; Hishinuma, I.; Okano, K.; Miyazawa, S.; Clark, R.; Ozaki, F.; Sato, N.; Shinoda, M.; Kamada, A.; Tsukada, I.; Matsuura, F.; Naoe, Y.; Terauchi, T.; Oohashi, Y.; Ito, O.; Tanaka, H.; Musya, T.; Kogushi, M.; Kawada, T.; Matsuoka, T.; Kobayashi, H.; Chiba, K.; Kimura, A.; Ono, N. Preparation of 2-iminoimidazole derivatives as thrombin receptor antagonists PCT Int. Appl. WO 2002088092, 2002.
160. Suzuki, S.; Kotake, M.; Miyamoto, M.; Kawahara, T.; Kajiwara, A.; Hishinuma, I.; Okano, K.; Miyazawa, S.; Clark, R.; Ozaki, F. Preparation of 2-iminopyrrolidine derivatives as thrombin receptor antagonists PCT Int. Appl. WO 2002085855, 2002.

161. Suzuki, S.; Kotake, M.; Miyamoto, M.; Kawahara, T.; Kajiwarra, A.; Hishinuma, I.; Okano, K.; Miyazawa, S.; Clark, R.; Ozaki, F. Preparation of cyclic amidine derivatives as thrombin receptor antagonists. PCT Int. Appl. WO 2002085850, 2002.
162. Safety and Tolerability of E5555 and Its Effects on Markers of Intravascular Inflammation in Subjects With Coronary Artery Disease. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00312052> (February 21, 2011).
163. Ahn, H. S.; Arik, L.; Boykow, G.; Burnett, D. A.; Caplen, M. A.; Czarniecki, M.; Domalski, M. S.; Foster, C.; Manna, M.; Stamford, A. W.; Wu, Y. Structure-activity relationships of pyrroloquinazolines as thrombin receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2073-2078.
164. Ahn, H. S.; Foster, C.; Boykow, G.; Stamford, A.; Manna, M.; Graziano, M. Inhibition of cellular action of thrombin by N₃-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl)phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3, 2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *60*, 1425-1434.
165. Ma, L.; Perini, R.; McKnight, W.; Dickey, M.; Klein, A.; Hollenberg, M. D.; Wallace, J. L. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, *102*, 216-220.
166. Kaufmann, R.; Rahn, S.; Pollrich, K.; Hertel, J.; Dittmar, Y.; Hommann, M.; Henklein, P.; Biskup, C.; Westermann, M.; Hollenberg, M. D.; Settmacher, U. Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J. Cell. Physiol.*, **2007**, *211*, 699-707.
167. Strande, J. L.; Hsu, A.; Su, J.; Fu, X.; Gross, G. J.; Baker, J. E. SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res. Cardiol.*, **2007**, *102*, 350-358.
168. Di Serio, C.; Pellerito, S.; Duarte, M.; Massi, D.; Naldini, A.; Cirino, G.; Prudovsky, I.; Santucci, M.; Geppetti, P.; Marchionni, N.; Masotti, G.; Tarantini, F. Protease-activated receptor 1-selective antagonist SCH79797 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by a protease-activated receptor 1-independent mechanism. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.*, **2007**, *101*, 63-69.
169. Chackalamannil, S.; Xia, Y.; Greenlee, W. J.; Clasby, M.; Doller, D.; Tsai, H.; Asberom, T.; Czarniecki, M.; Ahn, H. S.; Boykow, G.; Foster, C.; Agans-Fantuzzi, J.; Bryant, M.; Lau, J.; Chintala, M. Discovery of potent orally active thrombin

- receptor (protease activated receptor 1) antagonists as novel antithrombotic agents. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5884-5887.
170. Chackalamannil, S.; Wang, Y.; Greenlee, W. J.; Hu, Z.; Xia, Y.; Ahn, H. S.; Boykow, G.; Hsieh, Y.; Palamanda, J.; Agans-Fantuzzi, J.; Kurowski, S.; Graziano, M.; Chintala, M. Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3061-3064.
171. Shinohara, Y.; Goto, S.; Doi, M.; Jensen, P. Safety of the Novel Protease-Activated Receptor-1 Antagonist Vorapaxar in Japanese Patients with a History of Ischemic Stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **2010**, *19*.
172. Rilatt, I.; Mirabel, E.; Grand, B. L.; Perez, M. Discovery and SAR of small molecule PAR1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 903-906.
173. Planty, B.; Pujol, C.; Lamothe, M.; Maraval, C.; Horn, C.; Grand, B. L.; Perez, M. Exploration of a new series of PAR1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 1735-1739.
174. Perez, M.; Lamothe, M.; Maraval, C.; Mirabel, E.; Loubat, C.; Planty, B.; Horn, C.; Michaux, J.; Marrot, S.; Letienne, R.; Pignier, C.; Bocquet, A.; Nadal-Wollbold, F.; Cussac, D.; de Vries, L.; Le Grand, B. Discovery of Novel Protease Activated Receptors 1 Antagonists with Potent Antithrombotic Activity in Vivo. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5826-5836.
175. Létienne, R.; Leparq-Panissié, A.; Calmettes, Y.; Nadal-Wollbold, F.; Perez, M.; Le Grand, B. Antithrombotic activity of F 16618, a new PAR1 antagonist evaluated in extracorporeal arterio-venous shunt in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *79*, 1616-1621.
176. Chieng-Yane, P.; Bocquet, A.; Létienne, R.; Bourbon, T.; Sablayrolles, S.; Perez, M.; Hatem, S. N.; Lompré, A.-M.; Le Grand, B.; David-Duflho, M. Protease-Activated Receptor-1 Antagonist F 16618 Reduces Arterial Restenosis by Down-Regulation of Tumor Necrosis Factor α and Matrix Metalloproteinase 7 Expression, Migration, and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2011**, *336*, 643-651.
177. Covic, L.; Gresser, A. L.; Talavera, J.; Swift, S.; Kuliopulos, A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002**, *99*, 643-648.

178. Covic, L.; Misra, M.; Badar, J.; Singh, C.; Kuliopulos, A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat. Med.*, **2002**, *8*, 1161-1165.
179. Kostenis, E.; Conklin, B. R.; Wess, J. Molecular basis of receptor/G protein coupling selectivity studied by coexpression of wild type and mutant m2 muscarinic receptors with mutant G α (q) subunits. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1487-1495.
180. Ahn, H. S.; Foster, C.; Boykow, G.; Arik, L.; Smith-Torhan, A.; Hesk, D.; Chatterjee, M. Binding of a thrombin receptor tethered ligand analogue to human platelet thrombin receptor. *Mol. Pharm.*, **1997**, *51*, 350-356.
181. Andrade-Gordon, P.; Maryanoff, B. E.; Derian, C. K.; Zhang, H. C.; Addo, M. F.; Darrow, A. L.; Eckardt, A. J.; Hoekstra, W. J.; McComsey, D. F.; Oksenberg, D.; Reynolds, E. E.; Santulli, R. J.; Scarborough, R. M.; Smith, C. E.; White, K. B. Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 12257-12262.
182. Klabunde, T.; Hessler, G. Drug Design Strategies for Targeting G-Protein-Coupled Receptors. *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 928-944.
183. Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures. *Chem. Rev.*, **2003**, *103*, 893-930.
184. Knox, C.; Law, V.; Jewison, T.; Liu, P.; Ly, S.; Frolkis, A.; Pon, A.; Banco, K.; Mak, C.; Neveu, V.; Djoumbou, Y.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Wishart, D. S. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for "omics" research on drugs. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D1035-D1041.
185. Borio, P. The anthelmintic action of papain and of piperazine diphenylacetate (DPP). *Minerva Farm.*, **1953**, *2*, 141-142.
186. Vacca, J. P.; Dorsey, B. D.; Schleif, W. A.; Levin, R. B.; McDaniel, S. L.; Darke, P. L.; Zugay, J.; Quintero, J. C.; Blahy, O. M.; Roth, E. L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1994**, *91*, 4096-4100.
187. Nakao, Y.; Masuda, A.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Pseudotheonamides, Serine Protease Inhibitors from the Marine Sponge Theonella swinhoei. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2425-2431.

188. Kusel, J.; Hagan, P. Praziquantel - Its Use, Cost and Possible Development of Resistance. *Parasitology Today*, **1999**, *15*, 352-354.
189. Horwell, D. C.; Lewthwaite, R. A.; Pritchard, M. C.; Ratcliffe, G. S.; Ronald Rubin, J. The use of heterocycles for the conformational restriction of biologically active peptoids. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4591-4606.
190. Batt, A. R.; Kendrick, D. A.; Mathews, E.; Rooker, D. P.; Ryder, H.; Semple, G.; Szelke, M. Novel cholecystokinin receptor ligands: Oxopiperazines derived from Boc-CCK-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 867-872.
191. Tian, X.; Mishra, R. K.; Switzer, A. G.; Hu, X. E.; Kim, N.; Mazur, A. W.; Ebetino, F. H.; Wos, J. A.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Sheldon, R. J. Design and synthesis of potent and selective 1,3,4-trisubstituted-2-oxopiperazine based melanocortin-4 receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 4668-4673.
192. Zhang, Y.; Gilmour, B. P.; Navarro, H. A.; Runyon, S. P. Identifying structural features on 1,1-diphenyl-hexahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazin-3-ones critical for Neuropeptide S antagonist activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 4064-4067.
193. Kitamura, S.; Fukushi, H.; Miyawaki, T.; Kawamura, M.; Konishi, N.; Terashita, Z.-i.; Naka, T. Potent Dibasic GPIIb/IIIa Antagonists with Reduced Prolongation of Bleeding Time: Synthesis and Pharmacological Evaluation of 2-Oxopiperazine Derivatives. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2438-2450.
194. Sugihara, H.; Fukushi, H.; Miyawaki, T.; Imai, Y.; Terashita, Z.-i.; Kawamura, M.; Fujisawa, Y.; Kita, S. Novel Non-Peptide Fibrinogen Receptor Antagonists. 1. Synthesis and Glycoprotein IIb-IIIa Antagonistic Activities of 1,3,4-Trisubstituted 2-Oxopiperazine Derivatives Incorporating Side-Chain Functions of the RGDF Peptide. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 489-502.
195. Maryanoff, B. E.; Costanzo, M. J. Inhibitors of proteases and amide hydrolases that employ an α -ketoheterocycle as a key enabling functionality. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 1562-1595.
196. Su, T.; Yang, H.; Volkots, D.; Woolfrey, J.; Dam, S.; Wong, P.; Sinha, U.; Scarborough, R. M.; Zhu, B.-Y. Design, synthesis, and structure-Activity relationships of substituted piperazinone-Based transition state factor Xa inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 729-732.

197. Seibel, J.; Brown, D.; Amour, A.; Macdonald, S. J.; Oldham, N. J.; Schofield, C. J. Synthesis and evaluation of [δ]-Lactams (Piperazones) as elastase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 387-389.
198. Holsworth, D. D.; Cai, C.; Cheng, X.-M.; Cody, W. L.; Downing, D. M.; Erasga, N.; Lee, C.; Powell, N. A.; Edmunds, J. J.; Stier, M.; Jalaie, M.; Zhang, E.; McConnell, P.; Ryan, M. J.; Bryant, J.; Li, T.; Kasani, A.; Hall, E.; Subedi, R.; Rahim, M.; Maiti, S. Ketopiperazine-based renin inhibitors: Optimization of the "C" ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2500-2504.
199. Powell, N. A.; Clay, E. H.; Holsworth, D. D.; Bryant, J. W.; Ryan, M. J.; Jalaie, M.; Zhang, E.; Edmunds, J. J. Equipotent activity in both enantiomers of a series of ketopiperazine-based renin inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2371-2374.
200. Peng, H.; Carrico, D.; Thai, V.; Blaskovich, M.; Bucher, C.; Pusateri, E. E.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Synthesis and evaluation of potent, highly-selective, 3-aryl-piperazinone inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 1768-1784.
201. Cumming, J. N.; Le, T. X.; Babu, S.; Carroll, C.; Chen, X.; Favreau, L.; Gaspari, P.; Guo, T.; Hobbs, D. W.; Huang, Y.; Iserloh, U.; Kennedy, M. E.; Kuvelkar, R.; Li, G.; Lowrie, J.; McHugh, N. A.; Ozgur, L.; Pan, J.; Parker, E. M.; Saionz, K.; Stamford, A. W.; Strickland, C.; Tadesse, D.; Voigt, J.; Wang, L.; Wu, Y.; Zhang, L.; Zhang, Q. Rational design of novel, potent piperazinone and imidazolidinone BACE1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 3236-3241.
202. Herrero, S.; García-López, M. T.; Latorre, M.; Cenarruzabeitia, E.; Del Rio, J.; Herranz, R. 2-Oxopiperazine-based γ -turn conformationally constrained peptides: Synthesis of CCK-4 analogues. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3866-3873.
203. Zhang, H.-C.; Maryanoff, B. E.; Pandey, A.; Scarborough, R. M. Novel indazole peptidomimetics as thrombin receptor antagonists. US 2006/0166896 A1, 2006.
204. Tan, D. S. Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology. *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 74-84.
205. Schreiber, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, **2000**, *287*, 1964-1969.
206. Spandl, R. J.; Bender, A.; Spring, D. R. Diversity-oriented synthesis; a spectrum of approaches and results. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1149-1158.

207. Nielsen, T. E.; Schreiber, S. L. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 48-56.
208. Schreiber, S. L. Organic chemistry: Molecular diversity by design. *Nature*, **2009**, *457*, 153-154.
209. Hajduk, P. J.; Galloway, W. R.; Spring, D. R. Drug discovery: A question of library design. *Nature*, **2011**, *470*, 42-43.
210. González-Vera, J. A.; García-López, M. T.; Herranz, R. Potential of amino acid-derived α -amino nitriles for generating molecular diversity. *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2008**, *5*, 209-221.
211. Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2004**, *30*, 63-69.
212. Zhang, H.-C.; Maryanoff, B. E.; Pandey, A.; Scarborough, R. M. Novel indazole peptidomimetics as thrombin receptor antagonists. US 2006/0166896 A1, 2006.
213. Miyata, T.; Ishino, Y.; Hirashima, T. Catalytic reduction of aromatic nitro compounds with hydrazine hydrate in the presence of iron(III) oxide hydroxide. *Synthesis*, **1978**, *1978*, 834-835.
214. Ayyangar, N. R.; Lugade, A. G.; Nikrad, P. V.; Sharma, V. K. Catalytic reduction of nitroarenes with hydrazine hydrate in suitable solvents. *Synthesis*, **1981**, *1981*, 640-643.
215. Lauwiner, M.; Rys, P.; Wissmann, J. Reduction of aromatic nitro compounds with hydrazine hydrate in the presence of an iron oxide hydroxide catalyst. I. The reduction of monosubstituted nitrobenzenes with hydrazine hydrate in the presence of ferrihydrite. *Applied Catalysis A: General*, **1998**, *172*, 141-148.
216. Bartolomé-Nebreda, J. M.; Patiño-Molina, R.; Martín-Martínez, M.; Gómez-Monterrey, I.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Latorre, M.; Del Rio, J.; Herranz, R. 5-(tryptophyl)amino-1,3-dioxoperhydropyrido[1,2-c]pyrimidine-based potent and selective CCK1 receptor antagonists: Structure-activity relationship studies on the substituent at N2-position. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 2219-2228.
217. Herranz, R.; Suárez-Gea, M. L.; Vinuesa, S.; García-López, M. T. Studies on the synthesis of cyanomethyleneamino pseudopeptides. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 5186-5191.

218. Herrero, S.; Salgado, A.; García-Lopez, M. T.; Herranz, R. Synthesis of chiral 1,6,8-trioxoperhydropyrazino[1,2-c]pyrimidines as novel highly functionalized scaffolds for peptidomimetics. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 4899-4902.
219. Herrero, S.; García-López, M. T.; Herranz, R. Expedient one-pot synthesis of novel chiral 2-substituted 5-phenyl-1,4-benzodiazepine scaffolds from amino acid-derived amino nitriles. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 4582-4585.
220. Gonzalez-Vera, J. A.; Garcia-Lopez, M. T.; Herranz, R. Synthesis of indole alkaloid analogues containing the novel hexahydropyrrolo[1',2',3': 1,9a,9]imidazo[1,2-a]indole skeleton by ring-closing reactions of tryptophan-derived α -amino nitriles. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 9229-9234.
221. Gaucher, A.; Bintein, F.; Wakselman, M.; Mazaleyrat, J. P. Synthesis of α,α -disubstituted- β -aminoacids with axial chirality. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 575-578.
222. Dieter, R. K.; Li, S. J. Copper cyanide-catalyzed palladium coupling of N-tert-butoxycarbonyl-protected α -lithio amines with aryl iodides or vinyl iodides. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7726-7735.
223. Benoiton, N. L. On the side-reaction of N-alkylation of amino groups during hydrogenolytic deprotection in alcohol-containing solvents. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1993**, *41*, 611-611.
224. Ventosa-Andres, P., *Incursión en la investigación de agentes antiangiogénicos innovadores: Aproximación al diseño y síntesis de antagonistas del receptor de trombina PAR1*, Universidad Complutense de Madrid, 2012.
225. Bogan, A. A.; Thorn, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *280*, 1-9.
226. Gadek, T. R.; Nicholas, J. B. Small molecule antagonists of proteins. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *65*, 1-8.
227. Moreira, I. S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Hot spots - A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **2007**, *68*, 803-812.
228. Clackson, T.; Wells, J. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*, **1995**, *267*, 383-386.
229. Samanta, U.; Chakrabarti, P. Assessing the role of tryptophan residues in the binding site. *Protein Eng.*, **2001**, *14*, 7-15.

230. Yamamoto, Y.; Kojima, S. Synthesis and chemistry of guanidine derivatives. In *The chemistry of amidines and imidates*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, **1991**; Vol. 2, Cap. 10, pp 485-526.
231. Aláaume, M.; Gulko, A.; Herbstein, F. H.; Kapon, M.; Marsh, R. E. Comparison of the dimensions and conformation of the sulfaguanidine moiety in sulfaguanidine monohydrate and trans-dichlorobis(sulfaguanidine)palladium(II) *Acta Crystallogr. Sect. B* **1976**, *32*, 669-682. .
232. Sullivan, G. R.; Roberts, J. D. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. Structure of sulfaguanidine. *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 1095-1096.
233. Kanamori, K.; Roberts, J. D. A nitrogen-15 NMR study of the barriers to isomerization about guanidinium and guanidino carbon-nitrogen bonds in L-arginine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 4698-4701.
234. Zhang, W.-X.; Nishiura, M.; Hou, Z. Catalytic Addition of Amine N-H Bonds to Carbodiimides by Half-Sandwich Rare-Earth Metal Complexes: Efficient Synthesis of Substituted Guanidines through Amine Protonolysis of Rare-Earth Metal Guanidates. *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 4037-4051.
235. Fehrentz, J.-A.; Castro, B. An efficient synthesis of optically active α -(t-butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -amino acids. *Synthesis*, **1983**, *1983*, 676-678.
236. Rudolf, K.; Eberlein, W.; Engel, W.; Mihn, G.; Doods, H.; Wieland, H.-A.; Krause, J.; Dollinger, H.; Esser, F.; Schnorrenberg, G.; Entzeroth, M.; Wienen, W. Aminoacid derivatives, medicaments containing these compounds and process for preparing the same. WO 9417035 A1, 1994.
237. Yoshikazu, I.; Yoshiaki, S.; Yoshiharu, N.; Kenichi, U.; Bunshiyu, R.; Kazuhiko, T. Dipeptide derivative. JP 63211296 A, 1988.
238. Ko, E.; Liu, J.; Perez, L. M.; Lu, G.; Schaefer, A.; Burgess, K. Universal Peptidomimetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *133*, 462-477.
239. Boyd, M. R.; Paull, K. D. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.*, **1995**, *34*, 91-109.